



過敏性腸症候群を対象としたProbiotics対Placebo の無作為対照比較試験および腸内細菌叢分析について の検討

著者	多那 千繪
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/48142

博士論文

過敏性腸症候群を対象とした Probiotics 対 Placebo の 無作為対照比較試験および腸内細菌叢分析についての検討

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

機能医科学講座 行動医学分野

多那 千繪

目次

1. 要約	5
2. 研究背景	
2-1. 過敏性腸症候群	7
2-2. IBSにおける腸内細菌叢	7
2-3. 腸内細菌叢の変化と消化器症状	7
2-4. IBSにおける腸内発酵	8
2-5. 乳酸菌 <i>Bifidobacterium</i> の効果	8
3. 研究目的	10
4. 研究方法	
4-1. Study #1 IBS患者と健常者の比較	
4-1-1. 対象	11
4-1-2. 糞便検体サンプリング	11
4-1-3. 定量的ポリメラーゼ連鎖反応法	12
4-1-4. 培養法	13
4-1-5. 腸内有機酸測定	13
4-1-6. 腸内ガス量測定	14
4-1-7. 消化器症状、QOLおよび陰性情動の定量化	14
4-1-8. 統計解析	15
4-2. Study #2 乳酸菌による介入試験	
4-2-1. 対象	16
4-2-2. プロトコール	16
4-2-3. 乳酸菌	17
4-2-4. 末梢血サンプル	17
4-2-5. 統計解析	17

5. 結果

5-1. Study #1 IBS患者と健常者の比較

5-1-1. 腸内細菌叢	19
5-1-2. 腸内有機酸	19
5-1-3. 腸内細菌叢と腸内有機酸の関連	20
5-1-4. 腸内ガス量	20
5-1-5. 消化器症状、QOL、陰性情動	20
5-1-6. 腸内有機酸と消化器症状、QOL、陰性情動との関連	21
5-1-7. IBSのサブタイプと腸内細菌叢または腸内有機酸の関連	23

5-2. Study #2 乳酸菌による介入試験

5-2-1. プライマリーエンドポイント	23
5-2-2. セカンダリーエンドポイント	24
5-2-2-1. 質問紙検査	24
5-2-2-2. <i>B. breve</i> によるサイトカインへの影響	24
5-2-2-3. 腸内細菌叢	25
5-2-2-4. 腸内有機酸	25
5-2-2-5. 腸内ガス量	25
5-2-2-6. 腸内有機酸と消化器症状の関連	25
5-2-2-7. 腸内有機酸と視床下部-下垂体-副腎皮質系の関連	25

6. 考察	26
-------	----

7. 結論	34
-------	----

8. 謝辞	35
-------	----

9. 文献	36
-------	----

10. 図説	43
--------	----

11. 図 45

- 図 1. 腸内有機酸の比較 (Study #1)
- 図 2. 酢酸レベルとプロピオン酸レベルの相関分析 (Study #1)
- 図 3. 群Aと群Dの腸内有機酸の比較 (Study #1)
- 図 4. 腸内ガス量の比較 (Study #1)
- 図 5. 酢酸レベルと症状の関連 (Study #1)
- 図 6. プロピオン酸レベルと症状の関連 (Study #1)
- 図 7. 有機酸総量とIBS Severity Indexの腹部膨満感スコアの相関分析 (Study #1)
- 図 8. Self-reported IBS Questionnaireの腹痛・腹部不快感・軟便の複合スコアにおける *B. breve* の効果 (プライマリーエンドポイント)(Study #2)
- 図 9. 状態不安の正常値からの偏りへの *B. breve* の効果 (Study #2)
- 図 10. サイトカインレベルへの *B. breve* の効果 (Study #2)
- 図 11. 有機酸総量への *B. breve* の効果 (Study #2)
- 図 12. Δ 酢酸と Δ 消化器症状の相関分析 (Study #2)
- 図 13. Δ 有機酸総量と Δ 副腎皮質刺激ホルモンの相関分析 (Study #2)

12. 表 66

- 表 1. Study #1の対象
- 表 2. 16S r RNA標的遺伝子菌群特異的プライマー
- 表 3. Study #2の対象
- 表 4. 腸内細菌叢の比較 (Study #1)
- 表 5. 消化器症状、疾患関連QOLの比較 (Study #1)
- 表 6. 一般QOL、陰性情動の比較 (Study #1)
- 表 7. 腸内細菌叢への *B. breve* の効果 (Study #2)

1. 要約

背景: IBS (irritable bowel syndrome; 過敏性腸症候群) における腸内細菌叢構成の変化と消化器症状との関連性はいまだ明らかになっていない。先行研究では、乳酸菌の1種である *Bifidobacterium infantis* の投与がIBS治療に有用であることが報告されているが、同時に起こる腸内環境やサイトカインなど生理指標の変化はわかっていない。本研究では、以下の仮説を検証した。1. 腸内細菌叢は腸内有機酸レベルの増加を介して症状に影響している 2. *B. breve* (*Bifidobacterium breve*) の投与により消化器症状のほかに腸内環境やサイトカインも改善する

方法: Study #1 IBS患者26名と年齢・性別をマッチングさせた健常者26名を対象とした。糞便サンプルから腸内細菌叢と腸内有機酸を評価した。腸内ガス量は腹部X線写真から定量化し、質問紙検査から消化器症状, QOL (quality of life), 陰性情動を評価した。それぞれの評価項目について、IBS群と健常群の比較を行った。Study #2 IBS患者54名を *B. breve* 群 (n = 27) またはプラセボ群 (n = 27) に無作為に群分けし、被験者は *B. breve* またはプラセボを8週間服用した。プライマリーエンドポイントはIBS症状を Self-reported IBS Questionnaire、治療満足度を用いて評価した。セカンダリーエンドポイントとして、陰性情動やQOLを測定する質問紙を行い、さらに糞便サンプルから腸内細菌叢および腸内有機酸を評価、末梢血サンプルからは腫瘍壊死因子- α や血漿副腎皮質刺激ホルモンをはじめとする生理指標を評価した。

結果: Study #1 IBS群は *Veillonella* と *Lactobacillus* が健常群よりも有意に高値であった。さらに、IBS群は酢酸, プロピオン酸, 有機酸総量が健常群よりも有意に高かった。IBS群のうち、酢酸あるいはプロピオン酸の値が平均値よりも高い群では、健常群や平均値よりも低い群に比べてより消化器症状や陰性情動スコアが高く、QOLが低いことが示された。Study #2 Self-reported IBS Questionnaireにおける腹痛・腹部不快感・軟便の複合スコアは、服用期間中の *B. breve* 群でベースラインよりも有意に改善し、また腫瘍壊死因子- α の反復測定二元配置分散分析による分析でも、有意な群×期間の交互作用が認められた。 *B. breve* 群における状態不安の正常値からの偏りは治療後で有意にプラセボ群よりも低かった。 *B. breve* 投与は腸内細菌叢を変化させなかったものの、健常群よりも有意に高い有機酸濃度の有意差が消失した。全被験者において、服

用前後における酢酸の変化量と **Self-reported IBS Questionnaire** の変化量の間、また有機酸総量の変化量と血漿副腎皮質刺激ホルモンの変化量の間、それぞれ正相関が認められた。

結論: IBS患者では、腸内細菌叢および腸内有機酸プロファイルが健常者と異なっており、腸内細菌叢は腸内有機酸の過剰生産を介してIBS症状に影響している可能性が示唆された。また *B. breve* は腫瘍壊死因子- α の減少とともに症状を改善することが示唆された。

2. 研究背景

2-1. 過敏性腸症候群

IBS (irritable bowel syndrome; 過敏性腸症候群)は、便通異常や内臓知覚過敏と関連する慢性的腹痛・腹部不快感を特徴とした機能性消化管障害である¹⁻³⁾。その罹患率は約10~15%と高く、また感染性大腸炎発症後約10%の患者で、IBS様の症状が現れたという報告もある^{3,4)}。IBS患者はしばしば不安や抑うつといった心理的症状を併発しており、消化管症状と共にQOL (quality of life)を下げる原因となっている⁵⁻⁸⁾。IBSの病態として、内臓知覚過敏や消化管運動異常などの形で現れる脳腸相関の制御不全が分かっているが、これらの病態の原因についてはいまだ明らかになっていない^{3,9,10)}。先行研究では、心理的ストレスや遺伝的因子と並び、感染既往歴や腹部手術歴、低レベルな粘膜炎症、腸内細菌叢の変化といった消化管内における刺激もIBSの病態と関わっていることが示唆されている¹¹⁾。

2-2. IBSにおける腸内細菌叢

先行研究では、IBSにおける腸内細菌叢は健常者と異なることが報告されている¹²⁻¹⁷⁾。これまでに、IBS患者は健常者と比べて*Enterobacteriaceae*科や*Lactobacillus*グループ、*Clostridium coccooides*サブグループ、大腸菌のレベルが高く、*Bifidobacterium*グループや*Collinsella aerofaciens*、*Clostridium coccleatum*のレベルが低いことが報告されている。さらに、IBSのサブタイプによる分類でも腸内細菌叢の構成が異なることも示唆されている。しかしこれらのデータには下記のような問題点がある。1. 腸内細菌叢の生態系を考慮すると¹⁸⁾、調査されている細菌類は一部である 2. 評価方法が培養法や定量的ポリメラーゼ連鎖反応法と一貫しておらず、得られたデータも一致していない 3. 腸内細菌叢の構成とIBS症状との関連が調べられていない

2-3. 腸内細菌叢の変化と消化管症状

ヒトの腸内細菌叢は、複雑な生態系で構成されており、通常の状態では宿主に対し有益に影響する¹⁹⁾。感染性大腸炎の罹患や抗生物質の服用、幼少期におけるス

トレスなどが腸内細菌叢を変化させる要因であり、このことは機能性消化管症状の発現と関連している^{2,20-23)}。抗生物質を投与したマウスでは腸内細菌叢の構成が破壊され、直腸伸展刺激による内臓知覚過敏が増加したが、乳酸菌の投与はこの知覚過敏を正常化したことが先行研究で報告されている²¹⁾。また新生児期に母子分離によるストレスを与えたラットの腸内細菌叢は、対照群と比べて有意に変化していた^{22,23)}。動物モデルにおいて、腸内細菌叢確立期におけるストレスへの曝露は、細菌の定着や長期化する腸機能の変化をもたらす²³⁾。これらのことから、腸内細菌叢は消化管症状に影響していることが示唆されているが、その腸内細菌叢から消化器症状への生物学的経路はいまだ明らかになっていない。

2-4. IBSにおける腸内発酵

IBS患者において腸内発酵の変化やガス量の増加を示す先行研究がいくつかある²⁴⁻²⁸⁾。細菌代謝の主な産生物である短鎖脂肪酸に注目した先行研究では、下痢優勢型IBSにおいて短鎖脂肪酸が増加しており、便秘優勢型IBSでは減少していることを示した²⁶⁾。しかし、他の先行研究では反対に下痢優位型IBSで短鎖脂肪酸が減少しているとの報告もある²⁷⁾。このようにIBSを対象とした腸内発酵に関する先行研究は結果が一致しておらず、また腸内細菌との関連も調べられていない。従って、IBSにおいて消化器症状と同時に腸内細菌叢や腸内有機酸のプロフィールを分析する必要がある。

2-5. 乳酸菌*Bifidobacterium*の効果

先行研究では、乳酸菌の1種である*Bifidobacterium*グループはIBS患者の消化器症状に対して有効であることを示唆している²⁹⁻³¹⁾。O'Mahonyらは、IBSを対象に*Bifidobacterium infantis*の投与で腹部症状（腹痛、腹部膨満感、排便困難）とサイトカインプロフィールが改善したことを示した²⁹⁾。Guyonnetらも、*Bifidobacterium animalis*のIBS患者への投与が腹痛と腹部膨満感を改善させたことを報告している³⁰⁾。しかし、こうした効果はこれらの菌種特有のものか否かはまだ明らかになっていない。また先行研究では、腸内の*Bifidobacterium*を特異的に刺激するプレバイオティクスであるガラクトオリゴ糖によりIBS患者の消化器症状と不安が改善したことを報告して

おり³²⁾、従って*Bifidobacterium*の投与もまたIBSの陰性情動に影響する可能性が考えられる。

乳酸菌効果の生物学的メカニズムはまだ不明瞭なものの、炎症促進サイトカインの抑制がメカニズムの一部として示唆されている^{29,33-34)}。さらにいくつかの動物モデル研究では、乳酸菌を含む腸内細菌叢が視床下部-下垂体-副腎皮質系に影響することが示されている^{23,35)}。

3. 研究目的

本研究の目的は、以下の仮説を検証することである。 Study #1: (1) IBS患者は、健常者と異なる腸内細菌叢および有機酸プロファイルを示す (2) IBS症状は有機酸プロファイルと関連している Study #2: (3) *B. breve* (*Bifidobacterium breve*)の投与はIBS症状を改善する (4) *B. breve*はQOLや陰性情動、腸内細菌叢、腸内有機酸、サイトカイン、視床下部-下垂体-副腎皮質系や腸内ガス量を変化させる (5) 症状の改善は腸内有機酸と関連している (6) 視床下部-下垂体-副腎皮質系は腸内有機酸と関連している

4. 研究方法

4-1. Study #1 IBS患者と健常者の比較

4-1-1. 対象

IBS 患者は東北大学病院やキャンパス内で募集した。すべての被験者は疫学研究等で一般的に用いられている IBS スクリーニングツールである日本語版 Rome II modular questionnaire^{36,37)}により判断された後、Rome II 基準³⁸⁾をもとに医学的問診を受け、IBS として診断された。IBS 被験者は Rome III²⁾による分類で、便秘型 IBS が 11 名、下痢型 IBS が 8 名、混合型 IBS が 7 名の計 26 名であった。この患者群と年齢、性別ともにマッチングした、腹部症状の全くない 26 名の健常者を対照群とした (表 1)。実験に参加する直前の 1 カ月におけるヨーグルトの摂取頻度は、IBS 群と健常群で差はなかった。すべての被験者は、身体検査および臨床検査 (全血球計算、血液化学分析、血清高感度 C 反応性タンパク、糞便ヘモグロビン・トランスフェリン検出検査)と放射線検査 (腹部 X 線検査)を受け、器質的消化器疾患や全身性疾患、過去に腹部の手術歴や感染歴がある者、免疫不全症、妊婦は除外した。また、炎症性腸疾患の親戚をもつ被験者はいなかった。被験者は、研究に加わる前に書面によるインフォームドコンセントを得ており、本研究は、東北大学大学院医学系研究科の倫理委員会の承認を得ている (No. 2004-088)。

4-1-2. 糞便検体サンプリング

すべての被験者は、類似の先行研究に基づき³⁹⁾糞便サンプリングの予定日より2週間前から、ヨーグルトや乳酸菌を含む飲食物の摂取を控えるよう指示された。Brigidiらは、乳酸菌服用中止の10日後には腸内細菌の乳酸菌レベルが投与前の値に戻ることを報告しており⁴⁰⁾、本研究における2週間というヨーグルト摂取制限期間は妥当であると考えられる。またこの期間に抗生物質を服用した被験者はいなかった。すべての被験者から約1gの糞便サンプルを得、無菌のプラスチック容器に入れられたサンプルは、直ちに嫌気状態で冷蔵、36時間以内に分析にかけられた。

4-1-3. 定量的ポリメラーゼ連鎖反応法

定量的ポリメラーゼ連鎖反応法による分析のため、先行研究においてMatsukiらが記述した方法で糞便サンプルからデオキシリボ核酸が分離された⁴¹⁾。糞便サンプル (20 mg)は1.0 mlのリン酸緩衝生理的食塩水において懸濁液により3回洗浄され、ポリメラーゼ連鎖反応阻害物質を除去するためにそれぞれの標本は14,000 Gで遠心機にかけられた。糞便粒塊は450 µlの抽出バッファー (100 mM Tris-HCl, 40 mM EDTA, pH 9.0)と50 µlの10%ドデシル硫酸ナトリウムで再懸濁した。300 mgのガラスビーズ (直径0.1 mm)に500 µlの飽和フェノールと懸濁液が加えられ、混合物はFastPrep FP 120装置 (BIO 101, アメリカ合衆国カリフォルニア州)を用いてレベル5.0で30秒間渦流された。14,000 Gで5分間遠心機にかけた後、400 µlの上澄み液が集められた。続いて、フェノールクロロホルム抽出が行われ、250 µlの上澄み液がイソプロパノール沈殿に用いられた。最後にデオキシリボ核酸は1 mlのTris-EDTAバッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)で懸濁された。

ポリメラーゼ連鎖反応増幅と検出は、ABI PRISM 7900HT塩基配列検出装置 (Applied Biosystems, アメリカ合衆国カリフォルニア州)により行った。それぞれの反応混合物 (10 µl) は10 mMのTris-HCl (pH 8.3)、50mMのKCl, 1.5 mMのMgCl₂、それぞれに濃度200 µMのデオキシヌクレオシド三リン酸塩、1 : 75,000に希釈したSYBR Green I (Molecular Probes, アメリカ合衆国オレゴン州)、1µlにつき11 ngのTaqStart 抗体 (ClonTech, アメリカ合衆国カリフォルニア州) 、1µlにつき0.05 UのTaqデオキシリボ核酸ポリメラーゼ (タカラバイオ株式会社, 東京) で構成され、それぞれの特異的プライマーは濃度0.25 µM、 1×、10×または100×1 µl に希釈されたデオキシリボ核酸型で構成された。増幅プログラムは94℃で5分間が1サイクル、94℃で20秒間、55℃または50℃で20秒間、72℃で50秒間が40サイクル、最後に94度で15秒間が1サイクルであった。増幅産物の蛍光値は各サイクルの最後に検出した。溶解曲線分析は、ターゲットにしていらないポリメラーゼ連鎖反応産物からターゲットとしたポリメラーゼ連鎖反応産物を区別するために、増幅の後行われた⁴²⁾。溶解曲線は0.2℃/sの比率で徐々に60℃から95℃へ加熱し、継続的に蛍光値を測定することで得られた。

Ruminococcus productus YIT 6141^T、*Faecalibacterium prausnitzii* YIT 6174、*Bacteroides vulgatus* YIT 6159^T、*Bifidobacterium longum* YIT 4021^T、*Collinsella*

aerofaciens ATCC 25986^T、*Prevotella melaninogenica* YIT 6039^T、*Clostridium innocuum* YIT 10151^T、*Clostridium ramosum* YIT 10062^T、*Veillonella parvula* YIT 6072^T、*Fusobacterium varium* ATCC 8501^T から抽出されたデオキシリボ核酸はそれぞれ、*Clostridium coccoides*グループ、*Clostridium leptum*サブグループ、*Bacteroides fragilis*グループ、*Bifidobacterium*グループ、*Atopobium*群、*Prevotella*グループ、*Eubacterium cylindroides*グループ、*Clostridium ramosum*サブグループ、*Veillonella*グループ、*Fusobacterium*グループの群特異的プライマーのポリメラーゼ連鎖反応対照として用いられた⁴³⁻⁴⁵。分析対照についての詳細な記述は表 2に記載した。

4-1-4. 培養法

糞便サンプルは嫌気性バッファーで10倍に希釈され、さらに10段階に希釈し、グローブボックスの中でそれぞれの培養地に添付された。以下の培養地 (ニッケンバイオ株式会社, 京都)および培養条件を用いた。*Enterobacteriaceae* にはDHL (好気性, 1日, 37°C)、*Enterococcus*にはCOBA (好気性, 2日, 37°C)、*Lactobacillus*には調整済LBS (嫌気性, 3日, 37°C)、レンチナーゼ陽性*Clostridium*には卵黄を加えたCW (嫌気性, 1日, 37°C)。*Clostridium difficile*の評価では、糞便サンプルに嫌気性バッファーおよび95%エタノールを加えた30分後に調整済CCMAに添付した (嫌気性, 2日, 37°C)。コロニーの数を酵素免疫測定法により測定した(Diagnostics Inc., アメリカ合衆国オハイオ州)。細菌総数はMatsukiらの手法⁴⁴)に基づき、VectashieldとDAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories, アメリカ合衆国カリフォルニア州)を用いてデオキシリボ核酸を染色および封入した。電子顕微鏡で10イメージからカウントした。1イメージにつき最小で100個の細胞がカウントされた。

4-1-5. 腸内有機酸測定

糞便サンプルの一部は過塩素酸と遠心分離によりタンパク除去され、上澄み液は腸内有機酸分析に用いられた。Kikuchiらの手法に基づき、有機酸は高速液体クロマトグラフィーで測定した⁴⁶。測定は絶対検量曲線と2点検量曲線 (1 mMと20 mM)とともに、以下の8有機酸の標準を用いて行われた。酢酸, コハク酸, プロピオン酸, 蟻酸, 酪酸, 吉草酸, イソ吉草酸, リチウム乳酸塩のナトリウム塩類 (関東化学株式

会社, 東京)⁴⁴⁾。高速液体クロマトグラフィーは15 mMの過塩素酸, 60 mMのトリスヒドロキシメチルアミノメタン, pH調整剤として7%のアセトニトリル, 溶解カラムとして有機酸測定用カラムRSpak KC-811 (カラム温度42°C) (昭和電工株式会社, 東京) を用いて行われた。検出器は432電気伝導度検出器を用い、細胞温度は45°C、流量率は1.0 ml/分であった。

4-1-6. 腸内ガス量測定

腸内ガス量は、Koideらの先行研究の手法に基づき定量化された²⁵⁾。糞便検体サンプリングの前に腹部単純X線写真が撮られ、デジタル化されたレントゲン写真はパソコンに送られた。腸内ガスの範囲が同定され、そのアウトラインをモニター上でトレースした。トータルエリアの範囲は恥骨結合からの水平接線、横隔膜最上部からの水平接線、そして左右の肋骨最側部からの接線に囲まれた部分で、レントゲン写真のピクセル値として確定された。ガスボリュームスコアはトータルエリアにおける腸内ガス量のピクセル値の割合により計算された。

4-1-7. 消化器症状、QOL および陰性情動の定量化

IBS 患者と健常者における消化器症状、QOL および陰性情動が、有用性が検証された質問紙により評価された。IBS は腹痛・腹部不快感・便通異常といった消化器症状を特徴としているが、具体的に個人が感じる症状の内容は多様である。そのため、今回は IBS の消化器症状をより多面的に評価するため、それぞれ異なる特徴を持つ質問紙である日本語版 IBS Severity Index^{37,47)}、日本語版 Self-reported IBS Questionnaire⁴⁸⁾、日本語版 Gastrointestinal Symptoms Rating Scale^{49,50)}により定量化した。IBS Severity Index は IBS に特徴的な消化器症状の程度を測る指標であり、腹痛の程度・腹部膨満感の程度・排便についての満足度 (逆転項目)・消化器症状が日常生活に影響する程度の 4 項目について 0 から 100 までの数字で回答する他、腹痛の出現頻度や医療機関への受診頻度、近親者における IBS 罹患についての質問も含まれる。Self-reported IBS Questionnaire は腹痛や腹部不快感の他に、便の性状や排便状況、疾患関連の不安等に関する 14 項目の質問に、1 の「全くない」から 7 の「我慢できないくらい」の間で回答するものである。Gastrointestinal Symptoms Rating Scale は

IBS に特異的な質問紙ではなく、一般的な消化器症状について 1 の「全然困らなかった」から 7 の「我慢できないくらい困った」の間で回答するものであり、逆流、腹痛、消化不良、下痢、便秘の 5 つの下位尺度がある。疾患関連 QOL は日本語版 IBS-QOL (以下の 8 下位尺度を含む: 憂うつ、活動制限、ボディー・イメージ、健康に対する心配、食事回避、社会生活、性的問題、人間関係)により評価し⁵¹⁻⁵³⁾、一般的 QOL は日本語版 Short-Form 36-Item Health Survey (以下の 8 下位尺度を含む: 身体機能、日常役割機能(身体)、体の痛み、全体的健康感、活力、社会生活機能、日常役割機能(精神)、心の健康)により評価した^{54,55)}。陰性情動は、うつ病自己評価尺度^{56,57)}により抑うつを、状態-特性不安検査^{58,59)}により不安 (状態不安、特性不安)を、自覚ストレス調査票⁶⁰⁻⁶²⁾によりストレス感受性を、日本語版 Tronto Alexithymia Scale-20^{63,64)}により失感情症傾向を評価した。失感情症は機能性消化管障害の患者で頻繁にみられるパーソナリティ特性である⁶⁵⁾。近年の脳画像研究では失感情症傾向の個体は、腸管刺激に対し脳内における感情喚起ネットワークの過反応を示すことが明らかにされている⁶⁶⁾。Tronto Alexithymia Scale-20 により評価される失感情症傾向は、感情同定困難, 感情伝達困難, 機械的思考により特徴付けられる。

4-1-8. 統計解析

統計解析にはSPSS ver.12.0 (SPSS Japan, 東京)を用いた。サンプルサイズは健常群とIBS群の有機酸総量を比較することを前提に、先行研究²⁸⁾における有機酸総量の値を基準とし、 α エラー値を0.05、 β エラー値を0.2に設定の上検出力計算により決定した。IBS群と健常群間のカテゴリーデータの比較には、カイ二乗検定が用いられた。数値は平均値 \pm 標準偏差または中央値 (最小値-最大値)で表され、IBS群と健常群の比較にはスチューデントのt検定およびマン・ホイットニーのU検定を用いた。IBS群は酢酸平均値およびプロピオン酸平均値に基づき群分けされ、一元配置分散分析およびその後の検定が行われた。腸内有機酸と症状あるいは細菌との関連についての分析には相関分析を、IBSのサブタイプと細菌あるいは腸内有機酸の関連についての分析に一元配置分散分析を用いた。 $P < 0.05$ を有意とした。相関係数については、ピアソンの相関係数をr、スピアマンの相関係数をrsと標記した。症状に関する分析では、それぞれの質問紙における総合得点と、質問紙のもつすべての下位尺度について

分析を行ったが、解析結果にはその中で有意差が認められたものののみ記載した。

4-2. Study #2 乳酸菌による介入試験

4-2-1. 対象

Study #1 に参加した被験者に加えて、さらに同様の方法で被験者を募集した。IBS 被験者は Rome III によりサブタイプに分類された。また IBS 被験者と年齢・性別をマッチングさせた腹部症状の全くない健常者 54 名を、*B. breve* あるいはプラセボ服用後に測定指標が正常化されたかどうかの分析にデータ用いるため Study #1 と同様の方法でリクルートした。本研究は Clinical Trials Registration に登録されている (URL: www.clinicaltrials.gov, 試験番号: NCT00737841)。

4-2-2. プロトコール

すべての被験者は 2 週間の観察期間の後、*B. breve* 群 ($n = 27$, 男性 11 名, 女性 16 名; 便秘型 IBS:6 名, 下痢型 IBS:10 名, 混合型 IBS:11 名)またはプラセボ群 ($n = 27$, 男性 10 名, 女性 17 名; 便秘型 IBS:9 名, 下痢型 IBS:8 名, 混合型 IBS:10 名)に無作為に群分けされ、服用期間である 8 週間それぞれの薬を服用した。無作為割り付けは、スタディコーディネーターのもと年齢・性別・Rome III に基づく IBS サブタイプ・IBS Severity Index に基づく消化器症状の程度を基準に乱数表により行われ、実験者および被験者はトライアルが完了するまで割り付けを知らされなかった。両群は年齢・性別・IBS のサブタイプに有意差はなく、ヨーグルトの摂取頻度にも差はなかった (表 3)。被験者は *B. breve* またはプラセボ (用量 1.0 g)を 1 日 3 回食後に服用するよう指示された。服用状況は毎日日記に記載するという自己申告法で確認した。

服用期間 8 週間の後、服薬中止期間として 4 週間設けられた。プロトコール中の脱落者はいなかった。プロトコールの期間中 (14 週間)、被験者は腸内細菌叢に影響を与える可能性のある物質として、抗生物質や乳酸菌を含む飲食物の摂取を控えるよう指示された。

プライマリーエンドポイントは Self-reported IBS Questionnaire⁵⁰⁾および治療満足度⁶⁷⁾とした。被験者はプロトコールの期間中 (14 週間)、毎週末 Self-reported IBS Questionnaire と治療満足度に回答した。プロトコールの始めと服用期間の終わり (-2

週目および 8 週目)に、被験者はセカンダリーエンドポイントとして、前述した質問紙検査と採血検査・糞便検査・腹部 X 線検査を行った。糞便サンプルからは、定量的ポリメラーゼ連鎖反応法および培養法で腸内細菌叢を、高速液体クロマトグラフィーで腸内有機酸を測定し、腹部 X 線写真からは腸内ガス量を測定した。セーフティーエンドポイントは、異常な症状や血液科学検査における異常値を治療の有害事象とした。

4-2-3. 乳酸菌

本研究では、*Bifidobacterium breve* strain Yakult (*B. breve*)を乳酸菌として用いた。本株の効果として、*B. breve*を含む発酵乳で潰瘍性大腸炎の抑制および再発予防が確認されている^{68,69}。*B. breve*は乾燥重量で約 10^9 units/gのコロニーを含むコーンスターチの凍結乾燥粉末として提供され、プラセボは見た目・味ともに*B. breve*と同一である。

4-2-4. 末梢血サンプル

プロトコールの始めと治療期間の終わり (-2週目および8週目)で、末梢血サンプルを採取した。採血は午後3時~4時の間に行われた。血液は直接プレイン管 (6 ml) およびEDTA-2Na (5 ml)に採られ、直ちに遠心機により血漿と血清を分離、-20度以下で保存された。血清から腫瘍壊死因子- α が、血漿からトランスフォーミング成長因子- β が酵素免疫測定法により測定された。また、血清から免疫グロブリンEが蛍光酵素免疫測定法により測定され、高感度C反応性タンパクはラテックス免疫比濁法により測定された。血漿副腎皮質刺激ホルモンは電気化学発光免疫測定法で、血清コルチゾールは放射免疫検定法により測定された。

4-2-5. 統計解析

統計解析には SPSS ver.12.0 (SPSS Japan, 東京)を用いた。サンプルサイズは *B. breve* 群とプラセボ群の服用後の腫瘍壊死因子- α レベルを比較することを前提に、先行研究⁷⁰)における服用後の腫瘍壊死因子- α の値を基準とし、 α エラー値を 0.05、 β エラー値を 0.2 に設定の上検出力計算により決定した。各分析における被験者数は両群ともに 27 名ずつである。プライマリーエンドポイント分析では、Self-reported

IBS Questionnaire を用いたが、先行研究から腹痛・腹部不快感・軟便の複合スコアで分析を行った。分析には群と期間を要因とした反復測定二元配置分散分析を用い、その後の検定を行った。また群内の比較には一元配置分散分析を、群間の比較にはスチューデントの t 検定を用いた。治療満足度はカイ二乗検定により分析した。セカンダリーエンドポイントは群と期間を要因とした反復測定二元配置分散分析とスチューデントの t 検定を用いた。年齢・性別が一致した健常者 54 名における腸内有機酸データは、服用後の正常化の検定に用いられた。不安の正常値からの偏りを示すために、IBS 群の値から健常群の平均値を引くことで不安の偏りを計算した。仮説 5 および 6 の検証のため、 Δ 有機酸 (服用後の値 - 服用前の値) と Δ 症状間で、また Δ 有機酸と Δ 副腎皮質刺激ホルモン間で相関分析を行った (rs : スピアマンの相関係数)。 $P < 0.05$ を有意とした。セカンダリーエンドポイント分析では、それぞれの質問紙における総合得点と、質問紙のもつすべての下位尺度について分析を行ったが、解析結果にはその中で有意差が認められたものののみ記載した。なお、Rome III によるサブタイプごとの分析はサンプルサイズが小さく信頼性に欠ける可能性があるため、分析結果に含めていない。

5. 結果

5-1. Study #1 IBS患者と健常者の比較

5-1-1. 腸内細菌叢

定量的ポリメラーゼ連鎖反応法により測定された10菌種のうち、IBS群における *Veillonella* の菌数が健常群に比し有意に増加していた(健常群: $6.8 \pm 0.7 \log_{10}$ bacteria/g, IBS群: $7.2 \pm 0.8 \log_{10}$ bacteria/g, $P = 0.046$)(表 4)。しかし、他の菌種については両群の間に差は認められず、また定量的ポリメラーゼ連鎖反応法による細菌の検出率はすべての菌において、群間で差は認められなかった。培養法により測定した細菌については、IBS群における *Lactobacillus* の菌数が健常群に比し有意に増加していた (健常群: $4.6 \pm 1.6 \log_{10}$ bacteria/g, IBS群: $5.6 \pm 1.9 \log_{10}$ bacteria/g, $P = 0.031$)。 *Enterobacteriaceae* も *Enterococcus* も菌数については両群で差が認められなかった。レシチナーゼ陽性 *Clostridium* の平均値は検出率が低いため決定できなかった。しかし、IBS群におけるレシチナーゼ陽性 *Clostridium* の検出率 (42%) は有意に健常群 (69%) よりも低かった ($P = 0.046$)。培養法で測定したその他の菌種の検出率は両群で差は認められなかった。 *Clostridium difficile* はすべての被験者において検出されなかった。DAPI染色法により測定した細菌総数は両群で有意差は認められなかった。

5-1-2. 腸内有機酸

IBS群における酢酸レベルは、健常者に比べて有意に高値であった (健常群: $56.7 \pm 18.0 \mu\text{mol/g}$, IBS群: $67.0 \pm 18.8 \mu\text{mol/g}$, $P = 0.049$)(図 1)。さらに、プロピオン酸についても、IBS群で有意に高かった (健常群: $15.3 \pm 6.6 \mu\text{mol/g}$, IBS群: $20.5 \pm 9.2 \mu\text{mol/g}$, $P = 0.025$)。しかし、他の腸内有機酸については両群で差は認められなかった。腸内有機酸の総量については、IBS群で有意に高いという結果が得られた (健常群: $85.8 \pm 28.6 \mu\text{mol/g}$, IBS群: $107.1 \pm 31.1 \mu\text{mol/g}$, $P = 0.014$)。イソ吉草酸は1名のIBS被験者から検出され、吉草酸はどの被験者からも検出されなかった。酢酸およびプロピオン酸の検出率はどちらも100%だったが、他の腸内有機酸の検出率は100%以下だった。検出率について、健常群とIBS群の間に差は認められなかった。酢酸とプロピオン酸の間には有意な正相関が認められた (健常群 ($n = 26$): $r = 0.507$, $P =$

0.008, IBS群(n = 26), $r = 0.554$, $P = 0.003$, 全被験者 (n = 52), $r = 0.569$, $P < 0.001$)(図 2)。

5-1-3. 腸内細菌叢と腸内有機酸の関連

全被験者における *Veillonella* の中央値 ($7.10 \log_{10}$ bacteria/g)および *Lactobacillus*の中央値 ($5.15 \log_{10}$ bacteria/g)を用いて、被験者を以下の4群に分けた。
群 A: *Veillonella*, *Lactobacillus* とともに中央値よりも高値を示した者 (n = 17) 群 B: *Veillonella* は中央値よりも高く、*Lactobacillus* は中央値よりも低い者 (n = 10) 群 C: *Veillonella* は中央値よりも低く、*Lactobocillus* は中央値よりも高い者 (n = 9) 群 D: *Veillonella*, *Lactobacillus* とともに中央値よりも低値を示した者 (n = 16)

マン・ホイットニーの U 検定による群 A と群 D の比較では、群 A は群 D に比し有意に高い有機酸総量を示し (群 A: $113.7 \pm 29.7 \mu\text{mol/g}$, 群 D: $82.6 \pm 30.3 \mu\text{mol/g}$, $P = 0.037$)(図 3A)、また酢酸レベルも群間で有意傾向が見られた(群 A: $65.3 \pm 16.8 \mu\text{mol/g}$, 群 D: $54.8 \pm 19.8 \mu\text{mol/g}$, $P = 0.068$)(図 3B)。

5-1-4. 腸内ガス量

ガスボリュームスコアはIBS群と健常群の間で有意差は認められなかった (健常群: 0.046 ± 0.025 , IBS群: 0.043 ± 0.036 , $P = 0.778$)(図 4)。またガスボリュームスコアと腸内有機酸レベルの間にも相関は認められなかった。

5-1-5. 消化器症状、QOL、陰性情動

IBS 群は Self-reported IBS Questionnaire (健常群: 27.0, IBS 群: 51.0, $P < 0.001$)、IBS Severity Index (健常群: 30.0, IBS 群: 250.0, $P < 0.001$)、そして Gastrointestinal Symptoms Rating Scale のすべての下位尺度において有意に健常群よりも高い値を示した (健常群対 IBS 群; 逆流: 1.0 対 1.5, $P = 0.001$, 腹痛: 1.2 対 2.3, $P < 0.001$, 消化不良: 1.3 対 2.5, $P < 0.001$, 下痢: 1.0 対 3.2, $P < 0.001$, 便秘: 1.3 対 3.0, $P < 0.001$)(表 5)。また IBS 群は、疾患関連 QOL の尺度である IBS-QOL で、すべての下位尺度において健常者よりも低く (健常群対 IBS 群; 憂うつ: 100.0 対 81.3, $P < 0.001$, 活動制限 100.0 対 78.6, $P < 0.001$, ボディー・イメージ: 100.0 対 81.3, $P <$

0.001, 健康に対する心配: 100.0 対 83.3, $P < 0.001$, 食事回避: 100.0 対 79.2, $P < 0.001$, 社会生活: 100.0 対 84.4, $P < 0.001$, 性的問題: 100.0 対 100.0, $P = 0.010$, 人間関係: 100.0 対 91.7, $P < 0.001$)(表 5)、一般的 QOL を測る Short-Form 36-Item Health Survey においても身体機能以外のすべての下位尺度で有意に低かった (健常群対 IBS 群; 身体機能: 100.0 対 100.0, $P = 0.102$, 日常役割機能(身体): 100.0 対 90.6, $P = 0.005$, 体の痛み: 84.0 対 62.0, $P < 0.001$, 全体的健康感: 84.5 対 51.0, $P < 0.001$, 活力: 65.6 対 50.0, $P = 0.006$, 社会生活機能: 100.0 対 68.8, $P < 0.001$, 日常役割機能(精神): 91.7 対 50.0, $P = 0.010$, 心の健康: 72.5 対 57.5, $P = 0.010$)(表 6)。IBS 群は抑うつ (健常群: 34.0, IBS 群: 44.0, $P < 0.001$)、状態不安 (健常群: 39.5, IBS 群: 49.0, $P = 0.009$)、特性不安 (健常群: 42.5, IBS 群: 51.0, $P = 0.001$)、ストレス感受性 (健常群: 23.5, IBS 群: 31.0, $P = 0.005$)といった陰性情動も健常群より有意に高く、失感情症の 2 つの因子も有意に高いという結果だった(健常群対 IBS 群; 感情同定困難: 14.0 対 20.0, $P = 0.013$, 感情伝達困難: 14.0 対 15.0, $P = 0.514$, 機械的思考: 18.5 対 20.5, $P = 0.022$)(表 6)。

5-1-6. 腸内有機酸と消化器症状、QOL、陰性情動との関連

IBS群における酢酸平均値 (67.0 $\mu\text{mol/g}$)を用いて、IBS群を酢酸レベルの低い IBS群 ($n = 13$)と酢酸レベルの高いIBS群 ($n = 13$)の2群に分類した。一元配置分散分析では、IBS Severity Indexの下位尺度である腹痛の程度 ($P < 0.001$)(図 5A)および腹部膨満感の程度 ($P < 0.001$)(図 5B)、そしてShort-Form 36-Item Health Surveyの下位尺度である全体的健康感 ($P < 0.001$)(図 5C)において、健常群、酢酸レベルの低いIBS群、酢酸レベルの高いIBS群の3群間に有意差が認められた。その後の検定では、酢酸レベルの高いIBS群は低い群に比べて、腹痛 (高酢酸IBS群; 63.9 ± 5.5 , 低酢酸IBS群; 46.2 ± 7.1 , $P = 0.041$)、腹部膨満感 (高酢酸IBS群; 51.2 ± 9.1 , 低酢酸IBS群; 28.9 ± 7.1 , $P = 0.034$)が有意に高く、全体的健康感 (高酢酸IBS群; 45.3 ± 4.1 , 低酢酸IBS群; 62.3 ± 5.3 , $P = 0.036$)が有意に低いことが示され、また酢酸レベルの低いIBS群は健常群に比べて、腹痛 (健常群; 6.9 ± 2.3 , 低酢酸IBS群; 46.2 ± 7.1 , $P < 0.001$)、腹部膨満感 (健常群; 6.5 ± 2.2 , 低酢酸IBS群; 28.9 ± 7.1 , $P = 0.013$)が有意に高く、全体的健康感 (健常群; 78.8 ± 3.3 , 低酢酸IBS群; 62.3 ± 5.3 , $P = 0.017$)が有意に低いことが示された

(図 5A-C)。さらに、酢酸レベルの高いIBS群は低いIBS群よりもSelf-reported IBS Questionnaireの総スコアが有意に高く (高酢酸IBS群; 54.3 ± 2.3 , 低酢酸IBS群; 47.5 ± 2.3 , $P = 0.050$)、Short-Form 36-Item Health Surveyの下位尺度である活力 (高酢酸IBS群; 38.4 ± 5.4 , 低酢酸IBS群; 53.8 ± 5.7 , $P = 0.029$)が有意に低かった。

続いて、プロピオン酸の平均値 ($20.5 \mu\text{mol/g}$)を用いて、IBS群をプロピオン酸レベルの低いIBS群 ($n = 12$)とプロピオン酸レベルの高いIBS群 ($n = 14$)の2群に分類した。一元配置分散分析では、Gastrointestinal Symptoms Rating Scaleの総スコア ($P < 0.001$)(図 6A)および下位尺度である腹痛スコア ($P < 0.001$)(図 6B)、IBS Severity Indexの総スコア ($P < 0.001$)(図 6C)、Tronto Alexithymia Scale-20の下位尺度である機械的思考 ($P = 0.002$)(図 6D)において、健常群、プロピオン酸レベルの低いIBS群、プロピオン酸レベルの高いIBS群の3群間に有意差が認められた。その後の検定では、プロピオン酸レベルの高いIBS群は低い群に比べて、Gastrointestinal Symptoms Rating Scale総スコア (高プロピオン酸IBS群; 3.2 ± 0.3 , 低プロピオン酸IBS群; 2.4 ± 0.2 , $P = 0.009$)、Gastrointestinal Symptoms Rating Scale腹痛スコア (高プロピオン酸IBS群; 3.3 ± 0.5 , 低プロピオン酸IBS群; 2.3 ± 0.2 , $P = 0.023$)、IBS Severity Index総スコア (高プロピオン酸IBS群; 276.8 ± 24.5 , 低プロピオン酸IBS群; 210.2 ± 21.8 , $P = 0.042$)、Tronto Alexithymia Scale-20の機械的思考 (高プロピオン酸IBS群; 23.2 ± 1.3 , 低プロピオン酸IBS群; 19.4 ± 1.2 , $P = 0.043$)が有意に高く、またプロピオン酸レベルの低いIBS群は健常群に比べて、Gastrointestinal Symptoms Rating Scale総スコア (健常群; 1.4 ± 0.1 , 低プロピオン酸IBS群; 2.4 ± 0.2 , $P < 0.001$)、Gastrointestinal Symptoms Rating Scale腹痛スコア (健常群; 1.4 ± 0.1 , 低プロピオン酸IBS群; 2.3 ± 0.2 , $P = 0.015$)、IBS Severity Index総スコア (健常群; 45.8 ± 9.6 , 低プロピオン酸IBS群; 210.2 ± 21.8 , $P < 0.001$)が有意に高いことが示された (図 6A-D)。さらに、プロピオン酸レベルの高いIBS群は低いIBS群よりもIBS Severity Indexの腹痛の程度 (高プロピオン酸IBS群; 62.5 ± 7.6 , 低プロピオン酸IBS群; 48.6 ± 5.7 , $P = 0.046$)、および腹部膨満感の程度 (高プロピオン酸IBS群; 62.6 ± 7.3 , 低プロピオン酸IBS群; 20.7 ± 5.6 , $P < 0.001$)、特性不安 (高プロピオン酸IBS群; 58.8 ± 2.7 , 低プロピオン酸IBS群; 47.9 ± 3.4 , $P = 0.015$)が有意に高く、Short-Form 36-Item Healthの下位尺度である全体的健康感 (高プロピオン酸IBS群; 46.0 ± 5.2 , 低プロピオン酸IBS群;

60.5 ± 4.6, $P = 0.017$)が有意に低かった。

相関分析による結果も、腸内有機酸とIBS症状との関連を支持した。IBS Severity Indexの下位尺度である腹部膨満感の程度は、酢酸 (全被験者: $n = 52$, $rs = 0.387$, $P = 0.005$, IBS群: $n = 26$, $rs = 0.438$, $p = 0.025$)、プロピオン酸 (全被験者: $rs = 0.562$, $P < 0.001$, IBS群: $rs = 0.659$, $p < 0.001$)、腸内有機酸の総量 (全被験者: $rs = 0.409$, $P = 0.003$, IBS群: $rs = 0.460$, $p = 0.018$)(図 7)と有意な正相関が認められた。

5-1-7. IBSのサブタイプと腸内細菌叢または腸内有機酸の関連

一元配置分散分析では*Lactobacillus*のレベルにおいて、健常群、下痢型IBS群、便秘型IBS群、混合型IBS群の間で有意差が認められた ($P = 0.047$)。しかし、その後の検定では有意差が認められなかった。また*Veillonella*についても、健常群、下痢型IBS群、便秘型IBS群、混合型IBS群の間で有意差が認められた (健常群: $6.8 \pm 0.1 \log_{10}$ bacteria/g, 下痢型IBS群: $6.8 \pm 0.3 \log_{10}$ bacteria/g, 便秘型IBS群: $7.3 \pm 0.3 \log_{10}$ bacteria/g, 混合型IBS群: $7.7 \pm 21.8 \log_{10}$ bacteria/g, $P = 0.038$)。その後の検定では、混合型IBS群が健常群に比し有意に高いという結果であった ($P = 0.043$)。その他の菌種あるいは腸内有機酸については各群間で有意差は認められなかった。

5-2. Study #2 乳酸菌による介入試験

全被験者が14週間のプロトコルを完遂し、両群ともに有害事象や副作用は認められなかった。

5-2-1. プライマリーエンドポイント

2週間の観察期間中 (-2 - 0週目: ベースライン) *B. breve*群におけるSelf-reported IBS Questionnaireの腹痛、腹部不快感、軟便の複合スコアはプラセボ群と類似していた。反復測定二元配置分散分析の結果、Self-reported IBS Questionnaire複合スコアは有意な期間の効果 ($P < 0.0001$)と群×期間の交互作用 ($P = 0.036$)が認められた (図 8)。スチューデントのt検定では、*B. breve*群における服用期間5週目 (8.7 ± 2.1)は、プラセボ群における5週目 (10.7 ± 3.1 , $P = 0.007$)に比べて有意に低く、3週目 においても有意傾向が認められた (*B. breve*群: 9.1 ± 3.1 , プラセボ群: $11.0 \pm$

3.6, $P = 0.05$)。また一元配置分散分析の結果、*B. breve*群におけるSelf-reported IBS Questionnaire複合スコアは1, 2, 3, 4, 5, 7, 8週でベースラインよりも有意に低かったのに対し (すべて $P < 0.05$)、プラセボ群では治療期間中ベースラインとの差は認められなかった。服用中止期間のSelf-reported IBS Questionnaireはプライマリーエンドポイントではないが、*B. breve*群の複合スコアでは9, 10, 11, 12週でベースラインよりも有意に低く (すべて $P < 0.05$)、プラセボ群でも9, 10, 12週でベースラインよりも有意に低かった (すべて $P < 0.05$)。治療満足度は両群間で有意差は認められなかった。

5-2-2. セカンダリーエンドポイント

5-2-2-1. 質問紙検査

状態-特性不安検査の生値は群×期間の反復測定二次元配置分散分析で有意差は認められなかった。しかし、服用後における*B. breve*群の状態不安の正常値からの偏りは、プラセボ群よりも有意に低かった($P = 0.047$)(図 9)。服用後におけるそのほかの陰性情動 (抑うつ、ストレス感受性、失感情症傾向)は両群間で有意差は認められなかった。IBS Severity IndexおよびGastrointestinal Symptoms Rating Scaleにより定量化された消化器症状、IBS-QOLおよびShort-Form 36-Item Health Surveyにより評価されたQOLは両群間に有意差は認められなかった。

5-2-2-2. *B. breve*によるサイトカインへの影響

血清腫瘍壊死因子- α は、反復測定二元配置分散分析の結果有意差な期間×群の交互作用が認められた ($P = 0.015$)。Δ腫瘍壊死因子- α (服用後の値 - 服用前の値)はプラセボ群で陽性であったのに対し*B. breve*群では陰性で、有意な群間の差が認められた (図 10A)。一方、血漿トランスフォーミング成長因子- β は有意な群間の差は認められなかった (図 10B)。末梢血サンプルから評価したその他の項目は (副腎皮質刺激ホルモン、コルチゾール、免疫グロブリンE、高感度C反応性タンパク)、有意な群間の差は認められなかった。

5-2-2-3. 腸内細菌叢

服用前において、定量的ポリメラーゼ連鎖反応法で測定した10菌種および培

養法により測定した5菌種は、*Clostridium ramosum*を除いて両群に有意差は認められなかった (表 7)。服用後では、投与菌である*B. breve* (strain Yakult)は、*B. breve* 投与群27名中21名から検出され ($6.14 \pm 1.55 \log_{10}$ bacteria/g)、プラセボ投与群27名からは検出されなかった。DAPI染色法による細菌総数も両群で差は認められなかった。*Clostridium difficile*は服用前においてプラセボ群の1名で検出され、*B. breve*群では検出されなかった。服用後では*Clostridium difficile*はプラセボ群で4名検出され、*B. breve*群では検出されなかった。

5-2-2-4. 腸内有機酸

服用前において、腸内有機酸総量はプラセボ群 ($P = 0.034$) *B. breve*群 ($P = 0.011$)ともに健常者よりも有意に高かった。服用後では、プラセボ群の有機酸総量は健常者よりも高いままであったのに対し ($P = 0.012$)、*B. breve*群では健常者との有意差は消失した (図 11)。

5-2-2-5. 腸内ガス量

服用前のガスボリュームスコアはプラセボ群 (0.048 ± 0.033) *B. breve* 群 (0.053 ± 0.032)間で有意差は認められず、服用後においてもプラセボ群 (0.038 ± 0.021)、*B. breve* 群 (0.044 ± 0.037)ともに有意な変化は認められなかった。

5-2-2-6. 腸内有機酸と消化器症状の関連

全被験者における Δ 酢酸 (治療後の値 - 治療前の値)と Δ Self-reported IBS Questionnaireの総スコア間で有意な正相関が認められた ($n = 54$, $rs = 0.355$, $P = 0.008$) (図 12A)。また Δ 酢酸と Δ Gastrointestinal Symptoms Rating Scaleの下痢スコア間においても有意な正相関が認められた ($n = 54$, $rs=0.298$, $P=0.029$) (図 12B)。

5-2-2-7. 腸内有機酸と視床下部-下垂体-副腎皮質系の関連

全被験者における Δ 有機酸総量と Δ 血漿副腎皮質刺激ホルモン間にも有意な正相関が認められ ($n = 54$, $rs = 0.291$, $P = 0.033$)(図 13)、 Δ 有機酸総量と Δ コルチゾール間には有意傾向が見られた ($n = 54$, $rs = 0.241$, $P = 0.079$)。

6. 考察

本研究により、Study #1から健常者と異なる腸内細菌叢は腸内有機酸の生産を介してIBS症状に影響している可能性が示され、Study #2から*B. breve*は腫瘍壊死因子- α レベルの減少とともに消化器症状を改善することが示された。下記の7点から仮説は支持された。1. IBS患者は腸内の*Lactobacillus*および*Veillonella*レベルが健常者よりも高値であった 2. IBS患者は腸内の酢酸、プロピオン酸そして有機酸総量が健常者よりも高値であった 3. 高値の酢酸、プロピオン酸は消化器症状やQOL、陰性情動と関連していた 4. *B. breve*の投与はIBS症状を改善させた 5. *B. breve*の投与はIBS患者において、不安や腸内有機酸濃度、血清腫瘍壊死因子- α のレベルを変化させた 6. IBS症状の改善は腸内有機酸の変化と関連していた 7. 視床下部-下垂体-副腎皮質系の変化は腸内有機酸の変化と関連していた

本研究結果の*Lactobacillus*レベルは、IBS患者は健常者よりも高い (あるいは類似の) *Lactobacillus*レベルを示すと報告した先行研究と一致している^{14,15)}。またこの結果は、O'Mahonyらが示した*Lactobacillus*はIBS症状に効果を持たないという報告²⁹⁾を支持している。本研究結果の*Veillonella*レベルも、IBS患者は健常者よりも高い *Veillonella*レベルを示すという先行研究と一致している¹⁵⁾。本研究で、IBSにおいて腸内細菌叢とともに腸内有機酸のプロフィールも健常者と異なることが示された。IBSにおいて腸内有機酸濃度が高いという本研究結果は、Verniaら²⁸⁾のIBSでは短鎖脂肪酸が増加しているとする先行研究と一致している。さらに本研究からは、特に酢酸とプロピオン酸が高値であることが示された。腸内有機酸の増加は腸内細菌叢の変化と関連していることが考えられる。小腸内細菌異常増殖症候群を対象とした先行研究では、空腸内の短鎖脂肪酸分泌物の濃度が健常者の約4倍であることを報告している⁷¹⁾。彼らは、小腸内細菌異常増殖症候群患者は空腸における短鎖脂肪酸分泌の大部分が、空腸の変化した腸内細菌叢により産生されたと示唆している⁷¹⁾。さらに他の先行研究では、抗生物質の服用が短鎖脂肪酸分泌に著しく影響し、糞便中の短鎖脂肪酸濃度を減少させたことを示した⁷²⁾。*Lactobacillus*は、その発酵パターンから2つに分類される。ホモ発酵性*Lactobacillus*属はグルコースから乳酸のみを産生し、ヘテロ発酵性*Lactobacillus*属はグルコースまたはフラクトースから乳酸や酢酸を産生する⁷³⁾。

*Veillonella*は乳酸を酢酸およびプロピオン酸に変換させることで知られている^{74,75)}。

したがって本研究結果は、IBSでは増加した*Lactobacillus*や*Veillonella*が、腸管内の一般的な基質からより多くの酢酸やプロピオン酸を産生していることが示唆される。本研究において、腸内細菌叢と腸内有機酸を同時に測定したことにより、IBS患者の腸内細菌叢とその産生物のつながりを明らかにすることができた。

本研究結果の内臓感覚における腸内有機酸とIBS症状の関連は、増加した化学的刺激がIBSにおける発症または増悪因子の1つであることを示唆している。IBS患者の内臓知覚過敏は一般的に機械的感覚として考えられてきており¹⁰⁾、IBS患者の化学的感覚や化学的刺激についてはまだ多くが明らかになっていない。腸管は、脊髄神経と迷走神経という二重の神経支配を受けている¹⁰⁾。脊髄求心性神経は漿膜に終着し筋層に分布するのに対し、迷走求心性神経は上皮粘膜付近で終着し、そこで腸管腔から吸収された化学物質や腸内分泌細胞や免疫細胞から放出される伝達物質の暴露を受ける^{76,77)}。Aerssensらは、ストレス誘発炎症後内臓知覚過敏は化学的感覚の変化のために起こることを報告した⁷⁷⁾。ストレスを受け、また感染歴のあるマウスの求心性神経において、Trpv1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1) とTrpa1 (transient receptor potential cation channel subfamily A member 1)の遺伝子が多く発現していた⁷⁶⁾。Trpv1は酸受容性イオンチャネルの1つで、カプサイシンや有害な熱 (43度以上)、陽子 (酸性化)により活性化され、生体内で痛みの原因となる⁷⁸⁾。先行研究では、軽度の化学的刺激 (0.5 %の酢酸)を腸管内に注入した生後10日の仔ラットで、対照群と比べて大腸伸展刺激に対して高い感受性を示したという報告もされている⁷⁹⁾。また酢酸を注入したラットの脊髄後根神経節でTrpv1発現が増加しており、Trpv1アンタゴニストの投与で内臓知覚過敏が緩和された⁷⁹⁾。実際に、IBS患者の直腸S状結腸においてTrpv1神経線維が健常者よりも増加しており、増加したTrpv1神経線維は腹痛スコアと正相関することが報告されている⁸⁰⁾。また直腸過敏症患者でも感覚神経線維のTrpv1免疫反応力増加が報告されている⁸¹⁾。Trpa1もまた、迷走/骨盤粘膜求心性神経や内臓/骨盤、漿膜/腸間膜求心性神経の機械的感覚機能に寄与しており、様々な有害刺激による求心性神経の感作に関係している⁸²⁾。したがって、本研究で示されたIBSにおける高レベルな腸内有機酸はTrpv1を介して内臓知覚過敏に寄与している可能性が考えられる。今回IBSでは酢酸とプロピオン酸が有意に健常者よ

りも高く、症状との関連も認められたため、この2種類の腸内有機酸が特に症状と関わっていることが考えられるが、有機酸総量に占める酢酸やプロピオン酸の割合は他の腸内有機酸と比べて大きいためこれらの結果が得られた可能性も考えられる。ただし、結果には記載していないがその他の腸内有機酸と症状の相関分析を行うと、蟻酸や酪酸は酢酸・プロピオン酸と同様に正相関が認められるが、コハク酸では負の相関が認められ、乳酸は何の関連も認められなかった。従って腸内有機酸の組成によっても症状へ及ぼす影響は異なる可能性も考えられる。

本研究で、高レベルな酢酸やプロピオン酸は、QOLの低下や陰性情動とも関連していることが示された。Michlらは、腸粘膜の酸曝露による迷走求心性神経のシグナルは、感情や行動、神経内分泌系や自律神経系、有害刺激への抗侵害受容反応と関係する皮質下脳核の活性化を導くことを示唆している⁸³⁾。したがって、腸管における継続した酸刺激はQOLの低下や陰性情動を引き起こすかもしれない。本研究で、サブタイプにより分類したIBS下位群は腸内有機酸レベルとは関連しなかったが、*Lactobacillus*と *Veillonella* レベルと関連していた。先行研究でもIBSのサブタイプ間で腸内細菌叢が異なるとする報告がある¹⁵⁾。Malinenらは、*Lactobacillus* については下痢型IBSに比べて便秘型IBSで有意にレベルが高く、*Veillonella* については健常群に比べて便秘型IBSで有意にレベルが高い¹⁵⁾という結果を示している。しかし、こうしたIBS下位群間で腸内細菌叢を比較した先行研究はまだ数が少なく、結果も一致していないため、下位群におけるプロファイルの決定にはさらなる研究データが必要である。本研究では、それぞれのサブタイプのサンプルサイズが小さく、またIBS患者の消化管運動パターンは時間と共に変化する⁸⁴⁾ことが、先行研究との不一致の原因と考えられる。しかし、腸内細菌叢/腸内有機酸とGastrointestinal Symptoms Rating Scaleの下痢/便秘スコアの間に意味のある関連が認められなかったことは、IBSにおける変化した腸内細菌叢/有機酸プロファイルが内臓感覚と関連しているという考えを支持している。

Study #2 では、服用期間中に *B. breve* 群で Self-reported IBS Questionnaire の腹痛・腹部不快感・軟便の複合スコアがベースラインよりも減少したことが示された。*Bifidobacterium* の IBS 症状への効果については、先行研究において腹痛や腹部不快感、腹部膨満感のような腹部症状に効果があることが示唆されている²⁹⁻³¹⁾。

O'Mahony らは *Bifidobacterium infantis* が *Lactobacillus salivarius* よりも、より IBS 患者における腹部症状 (腹痛・腹部膨満感・排便困難) の改善に効果的であったことを示している²⁹⁾。Guyonnet らの報告でも、*Bifidobacterium animals* の投与は IBS 患者の腹痛や腹部膨満感を改善したことを示しており³⁰⁾、その他の研究でも、*Bifidobacterium infantis* 介入試験で、腹痛の他に腹部膨満感や腸の機能不全、排便機能異常、いきみ、ガスの通過などの腹部症状が改善したことを報告している³¹⁾。しかし本研究結果は、プラセボ群との有意差が認められたのは服用期間 5 週目のみであり、*B. breve* の IBS 症状への明白な効果は示されなかった。そのため、先行研究で示されている、*Bifidobacterium* 属の乳酸菌が IBS において主に腹痛や腹部不快感を緩和させる効果を持つという知見と本研究結果は方向性としては一致しているものの、先行研究で示されている他の *Bifidobacterium* 属の細菌 (*Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium animals* など) ほど改善効果は認められなかった。

また本研究結果では、*B. breve* は不安を減少させた。いくつかの先行研究でも乳酸菌あるいはプレバイオティクスの投与が不安に影響したことを示唆している^{31,84)}。慢性疲労症候群を対象に *Lactobacillus* を投与した先行研究では、ベースラインと比べて服用後に不安スコアが減少し⁸⁵⁾、また IBS 患者を対象とした研究でも、ガラクトオリゴ糖により消化器症状と不安が改善されたという報告がある³²⁾。本研究結果はこれらの先行研究と一貫し、乳酸菌 *Bifidobacterium* の投与が IBS 患者における消化器症状とともに不安に影響することを示唆した。

症状の改善をもたらす機序としては、まず炎症促進サイトカインの抑制が考えられる。本研究においても、*B. breve* 投与により血清腫瘍壊死因子- α レベルの改善が示されたが、腫瘍壊死因子- α は Trpv1 の活性を促進することで侵害受容器の過興奮や感作を増加させ内臓知覚過敏に寄与している⁸⁶⁾。先行研究でも *Bifidobacterium* を含む乳酸菌が、腫瘍壊死因子- α をはじめとする炎症促進サイトカインを減少させたことを報告している^{29,33,70)}。O'Mahony らは、IBS 患者を対象とした *Bifidobacterium infantis* 介入試験で、抗炎症サイトカインであるインターロイキン-10 の炎症促進サイトカインであるインターロイキン-12 に対する比率が正常化されたことを示した²⁹⁾。また健常老年者を対象に *Bifidobacterium* 増殖を刺激するプレバイオティクス、ガラクトオリゴ糖を投与した先行研究では、ガラクトオリゴ糖群においてプラセボ群、ベースラインよりも *Bifidobacterium* が増加しており、さらにガラクトオリゴ糖群では

食細胞活動やナチュラルキラー細胞の活性、インターロイキン-10が増加した一方、炎症促進サイトカイン（インターロイキン-6、インターロイキン-1 β 、腫瘍壊死因子- α ）が減少したことを示した⁷⁰⁾。動物モデルでも、インターロイキン-10 ノックアウトマウスに *Bifidobacterium infantis* を投与することで、炎症促進サイトカイン（インターロイキン-12、腫瘍壊死因子- α 、インターフェロン- γ ）が有意に減少したことが報告されている³³⁾。細胞レベルの研究では、乳酸菌（*Streptococcus*, *Lactobacillus*）がインターフェロン- γ や腫瘍壊死因子- α による腸のバリア機能への影響を防ぐ効果も確認されている³⁴⁾。これらのデータから、IBS における乳酸菌の効果のメカニズムに炎症促進サイトカインの産生抑制が関わっていることが示唆される。乳酸菌の投与がサイトカインを制御する機序についてはまだほとんど明らかになっていないが、いくつかの可能性が議論されている。1つは乳酸菌がトランスポーター発現を制御することで腸粘膜上皮におけるホメオスタシスを保護する³⁴⁾というものであるが、IBS では腫瘍壊死因子- α レベルは健常者と変わらないと報告されているため⁸⁷⁾、この示唆は腫瘍壊死因子- α レベルの高い炎症性腸疾患等で考えられる知見かもしれない。細胞レベルの研究では、殺菌した乳酸菌⁸⁸⁾や、乳酸菌を培養した培養基⁸⁹⁾でも免疫制御の効果が得られたことも報告されており、乳酸菌の活動や腸への定着よりも乳酸菌の構成要素や生産物が重要なのではないかとする知見もある。

またStudy #1から、IBSにおける高値の腸内有機酸が症状に影響している可能性が示唆されたが、Study #2では糞便中の有機酸濃度は服用後の*B. breve*群でプラセボ群よりも低く、また全被験者における分析で Δ 腸内有機酸と Δ IBS症状スコア間に有意な正相関が認められた。これはStudy #1の結果を支持するものではあるが、*B. breve*の服用前後での有意な腸内有機酸の減少は認められず、また相関関係に*B. breve*の効果は反映されていないため、*B. breve*が腸内有機酸を減少させる効果を持つかどうか、またそのことが症状の変化と関連しているかどうかは判断できない。しかし、先行研究では、*B. breve*を投与した低出生体重児では、投与していない低出生体重児に比べて生後14日目で糞便中の乳酸および酢酸、有機酸総量の濃度が有意に低く、また生後28日目では糞便中のプロピオン酸、酪酸が有意に低いことが示されている⁹⁰⁾。低出生体重児では、*Clostridium*のような嫌気性細菌による酪酸の過度な産生が壊死性全腸炎と関連していることが示唆されており、*Bifidobacterium*による*Clostridium*およ

び酪酸の抑制効果が期待されている^{91,92)}。そのため、IBSにおいても*B. breve*の投与が腸内有機酸を減少させる効果を持つ可能性は考えられる。また腸内有機酸の減少が症状の改善と関係しているとすれば、そのメカニズムの1つとしてTrpv1発現の減少を介している可能性が考えられるが、現時点でIBSを対象として*Bifidobacterium*の消化器症状と腸内有機酸への影響を同時に調査した報告は本研究の他にされていないため、メカニズムの解明にはさらなる研究が必要である。またサイトカインや腸内有機酸の他に乳酸菌の効果の機序に関連する可能性があるものとして考えられるのは、痛覚に関する伝達物質やレセプター発現の制御である。マウスを対象とした先行研究では、乳酸菌*Lactobacillus paracasei*が抗生物質により引き起こされた内蔵知覚過敏と同時に炎症マーカーであるミエロペルオキシダーゼ活性や痛覚神経の神経伝達物質であるサブスタンスPの活性を抑制したことが示された³⁴⁾。またヒトの上皮細胞における研究では、*Lactobacillus acidophilus*が鎮痛作用をもたらすオピオイドレセプターやカンナビノイドレセプターの発現を引き起こしたことも報告されている⁹³⁾。しかし、これらの効果はまだヒトを対象とした研究では確認されていないため、さらなる研究が必要である。

本研究ではΔ腸内有機酸とΔ副腎皮質刺激ホルモンの間に有意な正相関が示された。乳酸菌を含む腸内細菌叢の視床下部-下垂体-副腎皮質系への影響は様々な研究で調査されている^{23,35)}。Sudoらは、無菌マウスは拘束ストレスに対する副腎皮質刺激ホルモンおよびコルチコステロン反応が増加しており、視床下部-下垂体-副腎皮質系の活性が亢進していることを示した³⁵⁾。さらに無菌マウスにおける過度の視床下部-下垂体-副腎皮質系ストレス反応は*Bifidobacterium infantis*の再構成により抑制されたことを示した³⁵⁾。Gareauらはラットを対象とした研究で、母子分離による視床下部-下垂体-副腎皮質系亢進が*Lactobacillus*の投与により抑制されたことを示した²³⁾。本研究はこの効果をヒトで直接示したわけではないが、本研究結果はヒトにおいても腸内環境がストレス反応に影響する可能性を示唆している。

本研究の強みとして、腸内細菌叢と腸内有機酸レベル、IBS症状を同時に評価したことが挙げられる。次に、腸内細菌叢と腸内有機酸の間に因果関係が示唆されたこと、増加した腸内有機酸レベルがIBS症状の一部に関連していたことが挙げられる。またStudy #2では*B. breve*の効果を消化器症状だけでなく、腸内細菌叢や腸内有機酸

濃度といった生理指標についても評価したこと、腸内有機酸と消化器症状について **Study #1** で得られた結果を支持する結果が得られたことが挙げられる。一方限界点は、まず健常者とIBS患者の間で腸内ガス量に差が認められなかったことが挙げられる。この結果は先行研究²⁵⁾と一致していない。しかし本研究において、IBS患者は高い腹部膨満感のスコアを示しているため、腸内ガス量の増加など機械的刺激の強度の増加よりも、健常者と同等の機械的刺激に対して知覚過敏が増加していることがIBSにおいて重要かもしれない。また、被験者のヨーグルト摂取頻度以外について食行動を評価していない点も挙げられる。先行研究でも、IBS患者と健常者の食行動について比較した報告はなく、今後の研究に期待される。次に、今回分析された腸内細菌叢は不完全であることが挙げられる。*B. breve*の投与は、投与菌の検出を除いて腸内細菌叢の構成を変化させなかった。*B. breve*を投与した27名中21名で投与菌が検出されたため、6名の腸内環境では*B. breve*の増殖が困難であったか、あるいは糞便中の検出が不明瞭であったと考えられる。これら6名が*B. breve*を服用していなかった可能性は、プラセボまたは*B. breve*の服用を確認していたため否定できる。先行研究では、*Lactobacillus*の投与はラットの腸内の*Lactobacillus*レベルを変化させなかった²³⁾。

Study #1 でIBS患者の糞便*Bifidobacterium*レベルは健常者と同じであったため、乳酸菌の投与は*Bifidobacterium*の腸内での過剰定着とは独立してIBSに効果をもたらしたのかもしれない。また、腸内細菌は相互に影響しているため、今回測定対象としていない菌へ変化があった可能性も考えられる。また、本研究では腸内細菌叢や腸内有機酸を糞便1gの標本から解析しているが、この方法は多くの先行研究で用いられている確立された方法である。腸内細菌叢の構成は、同じ宿主の消化管内であっても栄養や酸素状態の影響を受けるためその部位によって異なるが、糞便に排出される細菌の組成 (1g)は大腸下部の細菌の組成と類似していることが確認されている。また、腸内有機酸は小腸で分解・吸収されなかったグルコースやフラクトースといった難解性多糖類を大腸に生息する細菌が分解する際に生産されるため、今回測定した腸内細菌叢および腸内有機酸は大腸下部の細菌叢構成および濃度を反映していると考えられる。本研究では糞便の総量は測定していないが、腸内における細菌や有機酸はすべてが糞便中に排出されるわけではないため、糞便1gの解析でも糞便総量の解析でも腸内における細菌・有機酸の全体量を測定するには、糞便に含まれる量から推測する点で同じである。

また本研究で着目しているのは、細菌や有機酸の腸内における全体量ではなく、腸内細菌叢のバランスや有機酸濃度であるため、糞便の総量を測定していないことは、本研究結果を考察する上で大きな影響はないものとする。

最後に、プラセボ群で服用中止後に**Self-reported IBS Questionnaire**の複合スコアが改善していたが、この理由について説明できない点も限界点として挙げられる。この結果は予測に反するものであったが、本研究におけるプラセボ群の**IBS**症状のグラフ形は先行研究と類似している²⁹⁾。

7. 結論

Study #1より、以下の3点が示唆された。1. IBS患者は腸内の*Lactobacillus*および*Veillonella*レベルが健常者よりも高値であった 2. IBS患者は腸内の酢酸、プロピオン酸そして有機酸総量が健常者よりも高値であった 3. 高値の酢酸、プロピオン酸は消化器症状やQOL、陰性情動と関連していた

またStudy #2より、以下の点が示唆された。1. *B. breve*の投与はIBS症状を改善させた 2. *B. breve*の投与はIBS患者において、不安や腸内有機酸濃度、血清腫瘍壊死因子- α のレベルを変化させた 3. IBS症状の改善は腸内有機酸の変化と関連していた 4. 副腎皮質刺激ホルモンの変化は腸内有機酸の変化と関連していた

今後はさらにヒトにおける脳-腸-細菌間の相関関係を明らかにする研究が期待される。

8. 謝辞

本論文を作成するにあたり、指導教官の福土審教授から、丁寧かつ熱心なご指導を賜りました。ここに感謝の意を表します。また、研究を通じて多くの知識や示唆を頂いた金澤素講師、梅崎良則さん、今岡明美さんに感謝いたします。試験の実施に際しては、ヤクルト中央研究所、東北大学病院検査部、東北大学病院放射線部の皆様のご協力をいただきました。論文の審査にあたっては、内科病態学の下瀬川徹教授、環境保健医学の佐藤洋教授、総合医療学の金村政輝講師、肢体不自由学の鈴嶋よしみ講師に大変有意義かつ詳細なコメントをいただきました。また、最後に研究にご協力いただいた被験者の皆様、日常の議論にお付き合いいただいた行動医学研究室の皆様へ心から感謝の気持ちと御礼を申し上げたく、謝辞にかえさせていただきます。

9. 文献

1. Chang L, Toner BB, Fukudo S, et al: Gender, age, society, culture, and the patient's perspective in the functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* 2006;130:1435-1446
2. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, et al: Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006;130:1480-1491
3. Drossman DA, Camilleri M, Mayer EA, et al: AGA technical review on irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002;123: 2108-31
4. Spiller R, Campbell E: Post-infectious irritable bowel syndrome. *Curr Opin Gastroenterol* 2006;22:13-7
5. Drossman DA: Do psychosocial factors define symptom severity and patient status in irritable bowel syndrome? *Am J Med* 1999;108:41S-50S
6. Whitehead WE, Crowell MD: Psychologic considerations in the irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Clin North Am* 1991;20:249-67
7. Pace F, Molteni P, Bollani S, et al: Inflammatory bowel disease versus irritable bowel syndrome: a hospital-based, case-control study of disease impact on quality of life. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:1031-8
8. Gralnek IM, Hays RD, Kilbourne A, et al: The impact of irritable bowel syndrome on health-related quality of life. *Gastroenterology* 2000;119: 654-60
9. Fukudo S, Nomura T, Muranaka M, et al: Brain-gut response to stress and cholinergic stimulation in irritable bowel syndrome. A preliminary study. *J Clin Gastroenterol*. 1993;17:133-41
10. Mayer EA, Collins SM: Evolving pathophysiological models on functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* 2002;122:2032-48
11. Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, et al: A role for inflammation in irritable bowel syndrome? *Gut* 2002;51(suppl 1):i41-4
12. Barsali A, Ceccarelli A, Dubini F, et al: The fecal microbial population in the irritable bowel syndrome. *Microbiologica* 1982;5:185-94
13. Jian-Min Si, Ying-Cong Yu, Yu-Jing Fan, et al: Intestinal microecology and quality of life in irritable bowel syndrome patients. *World J Gastroenterol* 2004;10:1802-05
14. Mättö J, Mannuksela L, Kajander K, et al: Composition and temporal stability of gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome – a longitudinal study in IBS and control subjects. *FEMS Immuno Med Microbiol* 2005;43:213-22
15. Malinen E, Rinttilä T, Kajander K, et al: Analysis of the microbiota of irritable bowel

syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *Am J Gastroenterol* 2005;100:373-82

16. Maukonen J, Satokari R, Mättö J, et al: Prevalence and temporal stability of selected clostridial groups in irritable bowel syndrome in relation to predominant faecal bacteria. *J Med Microbiol* 2006;55:625-33
17. Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Mökivuokko H, et al: The faecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of health subjects. *Gastroenterology* 2007;133:24-33
18. Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, et al: Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S r RNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3336-45
19. Sonnenburg JL, Angenendt LT, Gordon JI: Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nature Immunology* 2004;5:569-73
20. Spiller RC. Postinfectious irritable bowel syndrome: *Gastroenterology* 2003;124:1662-71
21. Verdú EF, Bercik P, Verma-Gandhu M, et al: Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. *Gut* 2006;55:182-90
22. O'Mahony SM, Marchesi JR, Scully P, et al: Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biol Psychiatry* 2009;65:263-7
23. Gareau MG, Jury J, MacQueen G, et al: Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. *Gut* 2007;56:1522-8
24. King TS, Elia M, Hunter JO: Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet* 1998;352:1187-9
25. Koide A, Yamaguchi T, Odaka T, et al: Quantitative analysis of bowel gas using plain abdominal radiograph in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1735-41
26. Mortensen PB, Andersen JR, Arffmann S, et al: Short-chain fatty acids and the irritable bowel syndrome: the effect of wheat bran. *Scand J Gastroenterol* 1987;22:185-92
27. Treem WR, Ahsan N, Kastoff G, et al: Fecal short-chain fatty acids in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: in vitro studies of carbohydrate fermentation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996;23: 280-6
28. Vernia P, Latella G, Magliocca FM, et al: Seeking clues for a positive diagnosis of the irritable bowel syndrome. *Eur J Clin Invest* 1987;17:189-93

29. O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, et al: Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relational to cytokine profiles. *Gastroenterology* 2005;128:541-51
30. Guyonnet D, Chassany O, Ducrotte P, et al: Effect of a fermented milk containing Bifidobacterium animalis DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double-blind, controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:475-86
31. Whorwell PJ, Altringer L, Morel J, et al: Efficacy of an encapsulated probiotic Bifidobacterium infantis 35624 in woman with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2006;101;1581-90
32. Silk DB, Davis A, Vulevic J, et al: Clinical trial: the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;29:508-18
33. McCarthy J, O'Mahony L, O'Callaghan L, et al: Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut* 2003;52:975-80
34. Resta - Lenert S, Barrett KE: Probiotics and commensals reverse TNF - alpha- and IFN - gamma- induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2006;130:731-46
35. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, et al: Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J physiol* 2004;558:263-75
36. Drossman DA, Talley NJ, Whitehead WE, et al: Research diagnostic questions for functional gastrointestinal disorders: Rome II modular questionnaire: investigations and respondent forms. In: Drossman DA, Corazziari E, Talley NJ, Thompson WG, editors. *Rome II: the functional gastrointestinal disorders*. 2nd ed. McLean, VA: Degnon Associates 2000;669-714
37. Shinozaki M, Kanazawa M, Sagami Y, et al: Validation of the Japanese version of the Rome II modular questionnaire and irritable bowel syndrome severity index. *J Gastroenterol* 2006;41:491-4
38. Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, et al: Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut* 1999;45(suppl 2):II43-7
39. Matsumoto K, Takeda T, Shimizu K, et al: The effects of a probiotic milk product containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the defecation frequency and the intestinal microbiota of sub-optimal health state volunteers: a randomized placebo-controlled cross-over study. *Bioscience Microbiota* 2006;25:39-48
40. Brigidi P, Vitali B, Swennen E, et al: Effects of probiotic administration upon the

- composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. *Res. Microbiol.* 2001;152:735-41
41. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al: Quantitative PCR with 16S rRNA-gene targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:76-73
 42. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT: Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997;245:154-60
 43. Matsuki T, Fujimoto J, Watanabe K: Group-specific PCR primers for the detection of human intestinal bacteria. Japanese patent 2007-20423
 44. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al: Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:5445-51
 45. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al: Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 2004;70: 7220-8
 46. Kikuchi H, Tajima T. Correlation between water-holding capacity of different types of cellulose in vitro and gastrointestinal retention time in vivo of rats: *J Sci Agric* 1992;60:139-46
 47. Francis CY, Morris J, Whowell PJ: The irritable bowel severity scoring system: a simple method of monitoring irritable bowel syndrome and its progress. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:395-402
 48. Shinozaki M, Fukudo S, Hongo M, et al: High prevalence of irritable bowel syndrome in medical out-patients in Japan. *J Clin Gastroenterol*, in press
 49. Svedlund J, Sjodin I, Dotevall G: GSRS – a clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. *Dig Dis Sci* 1988;33:129-134
 50. Hongo M, Fukuhara S, Green J, et al: Validation of the Japanese version of the gastrointestinal symptom rating scale (GSRS-J). *Gastroenterology* 1999;116:A65. (abstract)
 51. Patrick DL, Drossman DA, Frederick IO, et al: Quality of life in persons with irritable bowel syndrome: development and validation of a new measure. *Dig Dis Sci* 1998;43:400-411
 52. Drossman DA, Patrick DL, Whitehead WE, et al: Further validation of the IBS-QOL: a disease-specific quality-of-life questionnaire. *Am J Gastroenterol* 2000;95:999-1007
 53. Kanazawa M, Drossman DA, Shinozaki M, et al: Translation and validation of a

Japanese version of the irritable bowel syndrome-quality of life measure (IBS-QOL-J). *BioPsychoSoc Med* 2007;1:6 [epub]

54. Ware Jr JE, Sherbourne CD: The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care* 1992;30:473-83
55. Fukuhara S, Ware JE Jr, Kosinski M, et al: Psychometric and clinical tests of validity of the Japanese SF-36 Health Survey. *J Clin Epidemiol* 1998;51:1045-1053
56. Zung WW: A self-rating depression scale. *Arch Gen Psychiatry* 1965;12:63-70
57. Fukuda K, Kobayashi S: A study on a Self-rating Depression Scale. *Seishin Shinkeigaku Zasshi* 1973;75:673-679 (Japanese)
58. Spielberger CD, Gorsuch RL, Lushene RE: STAI manual. Palo Alto (CA): Consulting Psychologist Press, 1970;23-49
59. Nakazato K, Shimonaka Y: The Japanese State-Trait Anxiety Inventory: age and sex differences. *Percept Mot Skills* 1989;69:611-617
60. Cohen S, Kamarck T, Mermelstein R: A global measure of perceived stress. *J Health Soc Behav* 1983;24:385-396
61. Cohen S, Tyrrell DA, Smith AP: Psychological stress and susceptibility to the common cold. *N Engl J Med* 1991;325:606-612
62. Iwahashi S, Tanaka Y, Fukudo S, et al: The development of the Japanese version of the Perceived Stress Scale. *Jpn J Psychosom Med* 2002;42:459-466 (Japanese with English abstract)
63. Bagby RM, Parker JD, Taylor GJ: The twenty-item Toronto Alexithymia Scale--I. Item selection and cross-validation of the factor structure. *J Psychosom Res* 1994;38:23-32
64. Moriguchi Y, Meada M, Igarashi T, et al: Age and gender effect on alexithymia in a large Japanese community and clinical sample: a cross-validation study of the Toronto Alexithymia Scale. *BioPsychoSoc Med* 2007;1:7 [Epub]
65. Taylor GJ: Recent developments in alexithymia theory and research. *Can J Psychiatry* 2000;45:134-42
66. Kano M, Hamaguchi T, Itoh M, et al: Correlation between alexithymia and hypersensitivity to visceral stimulation in human. *Pain* 2007;132:252-263
67. Irvine EJ, Whitehead WE, Chey WD, et al: Design of treatment trials for functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* 2006;130:1538-51
68. Ishikawa H, Akedo I, Umesaki Y, et al: Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Coll Nutr* 2003;22:56-63

69. Kato K, Mizuno S, Umesaki Y, et al: Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:1133-41
70. Vulevic J, Drakoularakou A, Yaqoob P, et al: Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans - galactooligosaccharide mixture (B - GOS) in healthy elderly volunteers. *Am J Clin Nutr* 2008;88:1438-46
71. Hoverstad T, Bjornekleit A, Fausa O, et al: Short - chain fatty acids in the small - bowel bacterial overgrowth syndrome. *Scand JGastroenterol* 1985;20:492-9
72. Hoverstad T, Carlstedt - Duke B, Lingaas E, et al: Influence of oral intake of seven different antibiotics on faecal short - chain fatty acid excretion in health subjects. *Scand JGastroenterol* 1986;21:997-1003
73. Hegazi FZ, Abo-Elinaga IG. Degradation of organic acids by dairy lactic acid bacteria. *Zentralbl Bakteriol Naturwiss* 1980;135:212-22
74. Durant JA, Nisbet DJ, Ricke SC. Comparison of batch culture growth and fermentation of a poultry *Veillonella* isolate and selected *Veillonella* species grown in a defined medium. *Anaerobe* 1997;3:391-7
75. Kara D, Luppens SB, ten Cate JM. Differences between single- and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula* in growth, acidogenicity and susceptibility to chlorhexidine. *Eur J Oral Sci* 2006;114:58-63
76. Grundy D. Speculations on the structure / function relationship for vagal and splanchnic afferent endings supplying the gastrointestinal tract. *J Auton Nerv Syst* 1988;22:175-80
77. Aerssens J, Hillsley K, Peeters PJ, et al: Alteration in the Brain-Gut Axis Underlying Visceral Hypersensitivity in *Nippostrongylus brasiliensis*-Infected Mice. *Gastroenterology* 2007;132:1375-87
78. Tominaga M, Julius D. Capsaicin Receptor in the Pain Pathway. *Jpn. J. Pharmacol* 2000;83:20-24
79. Winston J, Shenoy M, Medley D, et al: The Vanilloid Receptor Initiates and Maintains Colonic Hypersensitivity Induced by Neonatal Colon Irritation in Rats. *Gastroenterology* 2007;132:615-27
80. Akber A, Yiangou Y, Facer P, et al: Increased capsaicin receptor TRPV1 - expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain. *Gut* 2008;57:923-9
81. Chan CL, Facer P, Davis JB, et al: Sensory fibres expressing capsaicin receptor TRPV1 in patients with rectal hypersensitivity and fecal urgency. *Lancet* 2003;361:385-91

82. Brierley SM, Hughes PA, Page AJ, et al: Novel and specific roles for the ion channel TRPA1 in visceral sensory transduction. *Gastroenterology* 2008;134 (Suppl 1): A8
83. Michl T, Jovic M, Heinemann A, et al: Vagal afferent signaling of a gastric mucosal acid insult to medullary, pontine, thalamic, hypothalamic and limbic, but not cortical, nuclei of the rat brain. *Pain* 2001;92:19-27
84. Drossman DA, Morris CB, Hu Y, et al: A prospective assessment of bowel habit in irritable bowel syndrome in women: defining an alternator. *Gastroenterology* 2005;128:580-589
85. Rao AV, Bested AC, Beaulne TM, et al: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut Pathog* 2009;1:6
86. Cheng JK, Ji RR: Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. *Neurochem Res* 2008;33:1970-8.
87. Dinan TG, Quigley EM, Ahmed SM, et al: Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology* 2006;130:304-11.
88. Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, et al: Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effect of probiotics in immune experimental colitis. *Gastroenterology* 2004;126:520-28.
89. Petrof EO, Kojima K, Ropeleski MJ, et al: Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology* 2004;127:1474-87.
90. Wang C, Shoji H, Sato H, et al: Effects of oral administration of *Bifidobacterium breve* on fecal lactic acid and short - chain fatty acids in low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44:252-7
91. Waligora - Dupriet AJ, Dugay A, Auseil, et al: Evidence for clostridial implication in necrotizing enterocolitis through bacteria fermentation in a gnotobiotic quail model. *Pediatr Res* 2005;58:629-35
92. Butel MJ, Roland N, Hibert A, et al: Clostridial pathogenicity in experimental necrotizing enterocolitis in gnotobiotic quails and prospective role of bifidobacteria. *J Med Microbiol* 1998;47:391-9
93. Rousseaux C, Thuru X, Gelot A, et al: *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat Med* 2007;13:35-7.

10. 図説

図 1. 腸内有機酸の比較 値 ($\mu\text{mol/g}$)は平均値で示し、比較にはスチューデントの t 検定を用いた。* $P < 0.05$

図 2. 酢酸レベルとプロピオン酸レベルの相関分析 相関係数 $r = 0.569$, $P < 0.001$

図 3. 群 A と群 D の腸内有機酸の比較; (A) 有機酸総量, (B) 酢酸 値 ($\mu\text{mol/g}$)は平均値 \pm 標準偏差で示し、比較にはマン・ホイットニーの U 検定を用いた。* $P < 0.05$

図 4. 腸内ガス量の比較 値は平均値 \pm 標準偏差で示し、比較にはスチューデントの t 検定を用いた。有意差なし。

図 5. 酢酸レベルと症状の関連; (A) IBS Severity Index の腹痛の程度, (B) IBS Severity Index の腹部膨満感の程度, (C) Short-Form 36-Item Health Survey の全体的健康感 値は平均値 \pm 標準偏差で示し、比較には一元配置分散分析 (A, B, C ともに $P < 0.001$)とその後の検定を用いた。その後の検定: * $P < 0.05$ 対低酢酸 IBS 群, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 対健常群

図 6. プロピオン酸レベルと症状の関連; (A) Gastrointestinal Symptoms Rating Scale の腹痛スコア, (B) Gastrointestinal Symptoms Rating Scale の総スコア, (C) IBS Severity Index の総スコア, (D) Tronto Alexithymia Scale-20 の機械的思考 値は平均値 \pm 標準偏差で示し、比較には一元配置分散分析 (A, B, C ともに $P < 0.001$, D は $P = 0.002$)とその後の検定を用いた。その後の検定: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 対低プロピオン酸 IBS 群, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 対健常群

図 7. 有機酸総量と IBS Severity Index の腹部膨満感スコアの相関分析 スピアマンの相関係数 $r_s = 0.409$, $P = 0.003$

図 8. Self-reported IBS Questionnaire の腹痛・腹部不快感・軟便の複合スコアにおける *B. breve* の効果 (プライマリーエンドポイント) 値は平均値 \pm 標準偏差で示し、反復測定二元配置分散分析の結果、有意な期間の効果 ($P < 0.0001$)と、群 \times 期間の相互作用が認められた ($P = 0.036$)。群内の比較には一元配置分散分析およびその後の検定を用い (プラセボ群; $P = 0.0017$, *B. breve* 群; $P < 0.0001$, * $P < 0.05$ 対ベースライン)、群間の比較にはスチューデントの t 検定を用いた (* $P < 0.05$ 対プラセボ群)。

図 9. 状態不安の正常値からの偏りへの *B. breve* の効果 値は平均値 \pm 標準偏差で示し、群間の比較にはスチューデントの t 検定を用いた。* $P = 0.047$ 対プラセボ群

図 10. サイトカインレベルへの *B. breve* の効果; (A) 腫瘍壊死因子- α (pg/ml), (B) トランスフォーミング成長因子- β (ng/ml). 値は平均値 \pm 標準偏差で示し、反復測定二元配置分散分析の結果腫瘍壊死因子- α において有意な群 \times 期間の交互作用が認められた ($P = 0.015$)。服用前後の変化量の群間の比較はスチューデントの t 検定を用いて行い、腫瘍壊死因子- α では有意な群間の差が認められたが ($P = 0.015$)、トランスフォーミング成長因子- β では有意差は認められなかった。

図 11. 有機酸総量への *B. breve* の効果 値は平均値 \pm 標準偏差で示し、一元配置分散分析の結果、服用前のプラセボ群、服用前の *B. breve* 群ともに健常群に比べて高値であるのに対し、服用後では *B. breve* 群のみ健常者との有意差は消失した。 $*P < 0.05$ 対健常群

図 12. Δ 酢酸と Δ 消化器症状の相関分析; (A) Δ 酢酸 \times Δ Self-reported IBS Questionnaire (SIBSQ)総スコア (B) Δ 酢酸 \times Δ Gastrointestinal Symptoms Rating Scale (GSRS)下痢スコア スピアマンの相関係数(A); $r_s = 0.355$, $P = 0.008$, (B); $r_s = 0.298$, $P = 0.029$

図 13. Δ 有機酸総量と Δ 副腎皮質刺激ホルモンの相関分析 スピアマンの交換係数 $r_s = 0.291$, $P = 0.033$

表 1. Study #1 の対象 値は平均値 \pm 標準偏差で示し、年齢の比較にはスチューデントの t 検定を、性別の比較にはカイ二乗検定を、ヨーグルトの摂取頻度にはマン・ホイットニーの U 検定を用いた。群間に有意差は認められなかった。

表 2. 16S rRNA 標的遺伝子菌群特異的プライマー

表 3. Study #2 の対象 値は平均値 \pm 標準偏差で示し、年齢の比較にはスチューデントの t 検定を、性別と IBS のサブタイプの比較にはカイ二乗検定を、ヨーグルトの摂取頻度にはマン・ホイットニーの U 検定を用いた。群間に有意差は認められなかった。

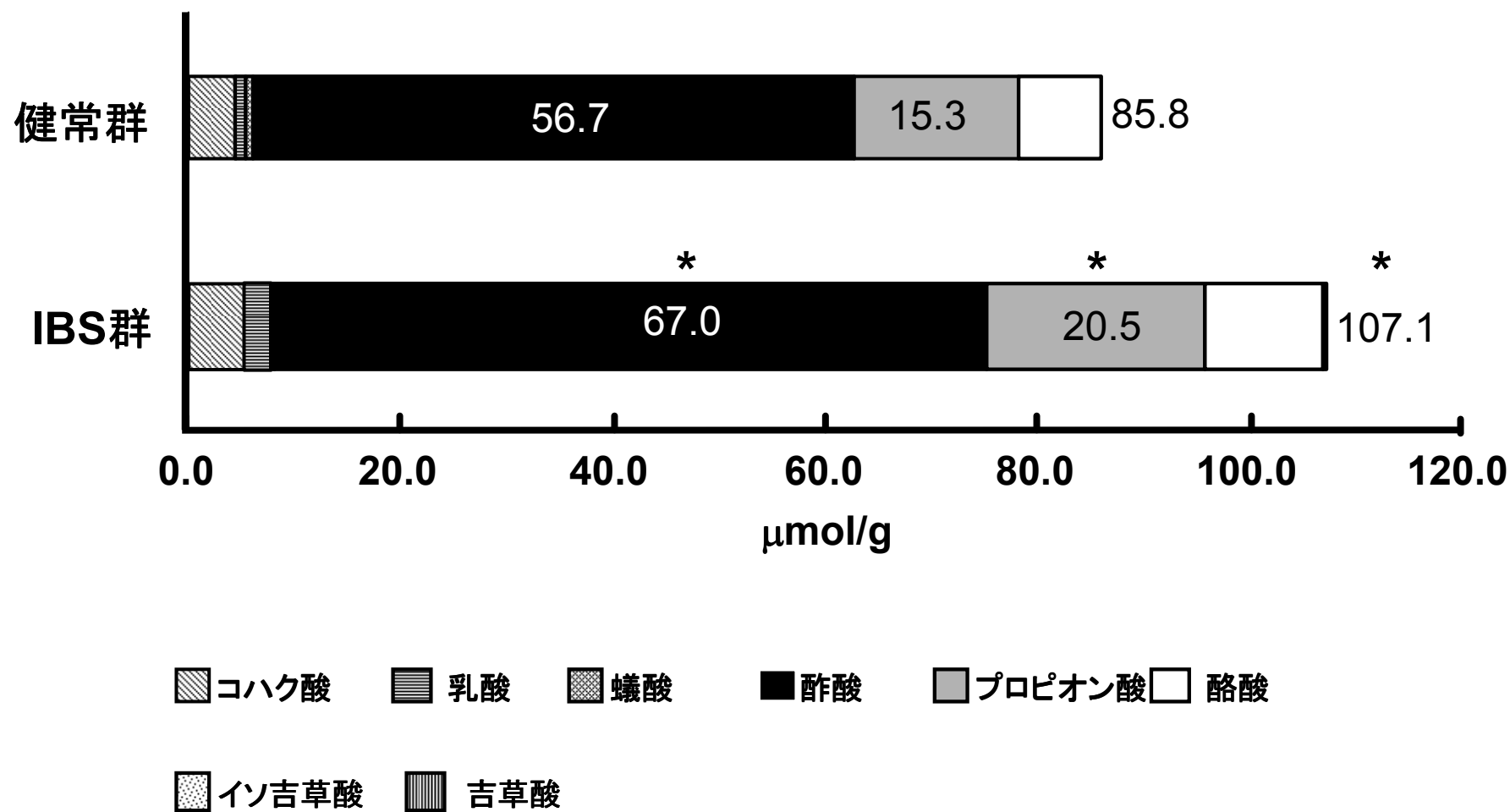
表 4. 腸内細菌叢の比較 値 (\log_{10} bacteria/g)は平均値 \pm 標準偏差 (検出率%)で示し、比較にはスチューデントの t 検定を用いた。 $*P < 0.05$

表 5. 消化器症状、疾患関連 QOL の比較 値は中央値 (最小値 – 最大値)で示し、比較にはマン・ホイットニーの U 検定を用いた。 $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

表 6. 一般的 QOL、陰性情動の比較 値は中央値 (最小値 – 最大値)で示し、比較にはマン・ホイットニーの U 検定を用いた。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

表 7. 腸内細菌叢への *B. breve* の効果 値 (\log_{10} bacteria/g)は平均値 \pm 標準偏差で示し、分析には群 \times 期間の反復測定二元配置分散分析を用いた。*Atopobium* 群には群 \times 期間の交互作用の有意傾向があり ($^{\Delta}P = 0.069$)、*Clostridium leptum* サブグループおよび *Bacteroides fragilis* グループには有意な期間の効果が ($*P < 0.05$)、*Clostridium ramosum* サブグループには有意な群の効果が認められた ($^{\Delta}P = 0.018$)。

11. 図



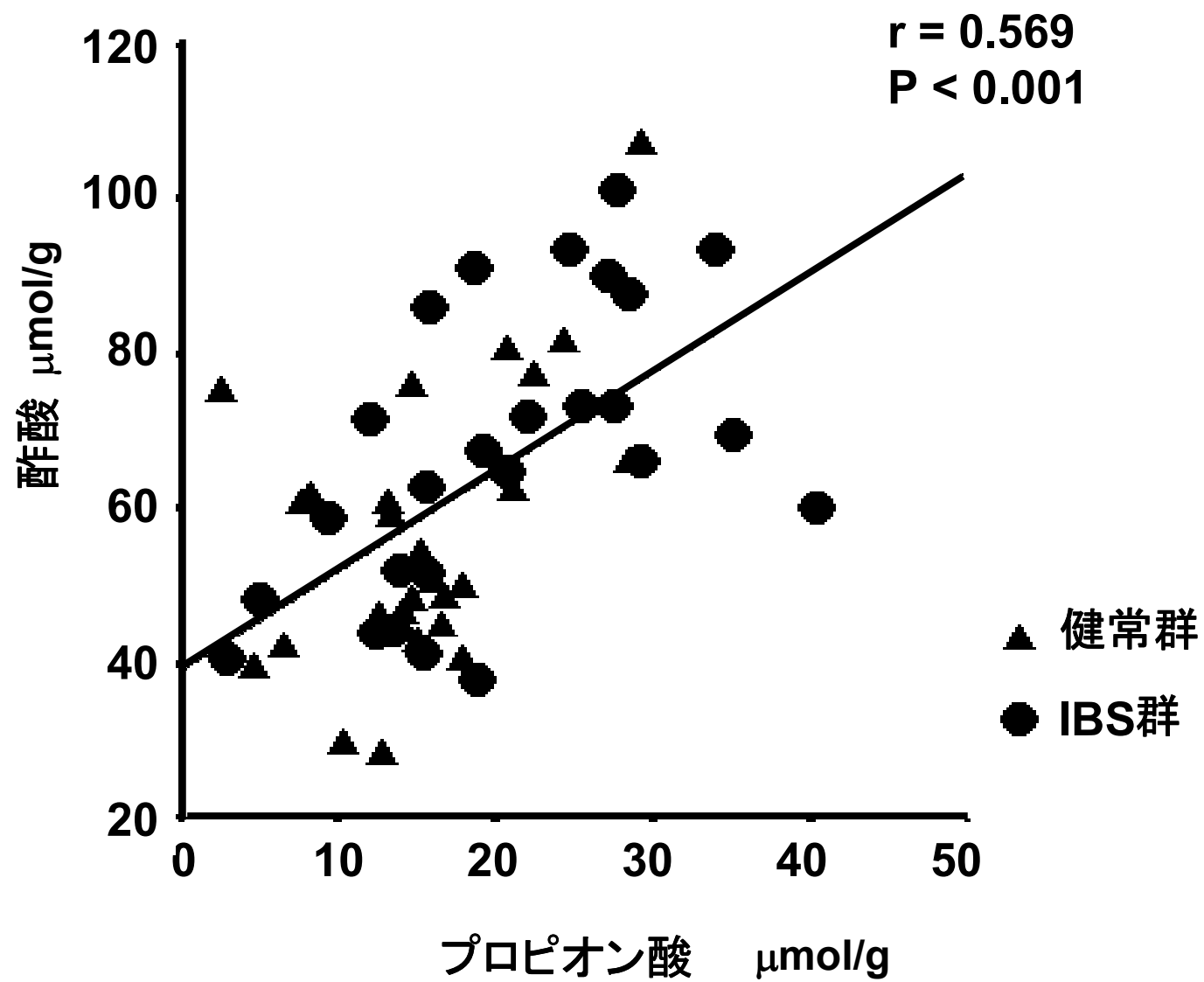


図 2. 酢酸レベルとプロピオン酸レベルの相関分析
相関係数 $r = 0.569$, $P < 0.001$

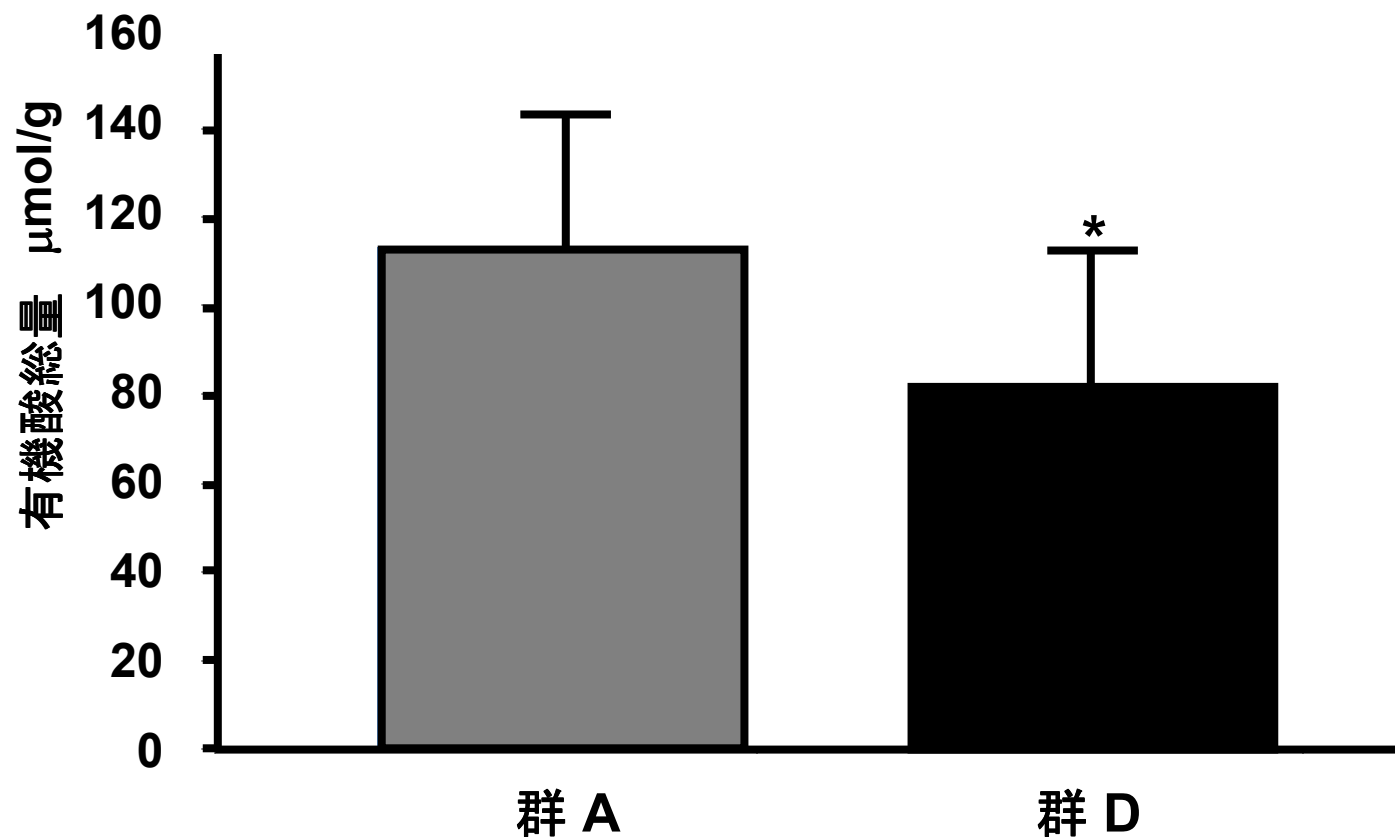


図 3A.有機酸総量における群Aと群Dの腸内有機酸の比較

群A: *Lactobacillus*, *Veillonella*ともに高値群, 群B: *Lactobacillus*, *Veillonella*ともに低値群

値 ($\mu\text{mol/g}$)は平均値 \pm 標準偏差で示し、比較にはマン・ホイットニーのU検定を用いた。* $P < 0.05$

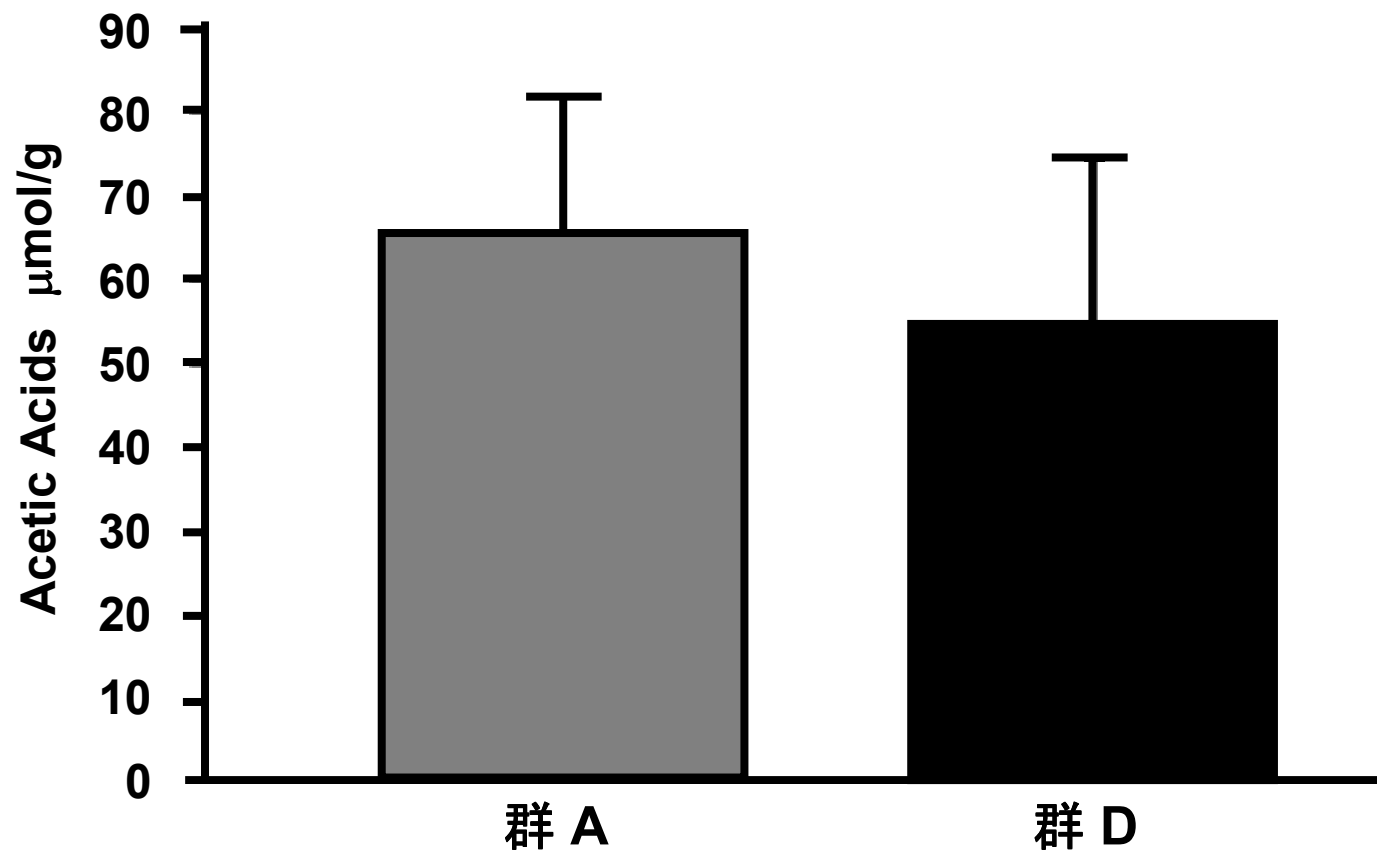


図 3B: 酢酸における群Aと群Dの腸内有機酸の比較

群A: *Lactobacillus*, *Veillonella*ともに高値群, 群B: *Lactobacillus*, *Veillonella*ともに低値群

値 ($\mu\text{mol/g}$)は平均値 \pm 標準偏差で示し、比較にはマン・ホイットニーのU検定を用いた。* $P < 0.05$

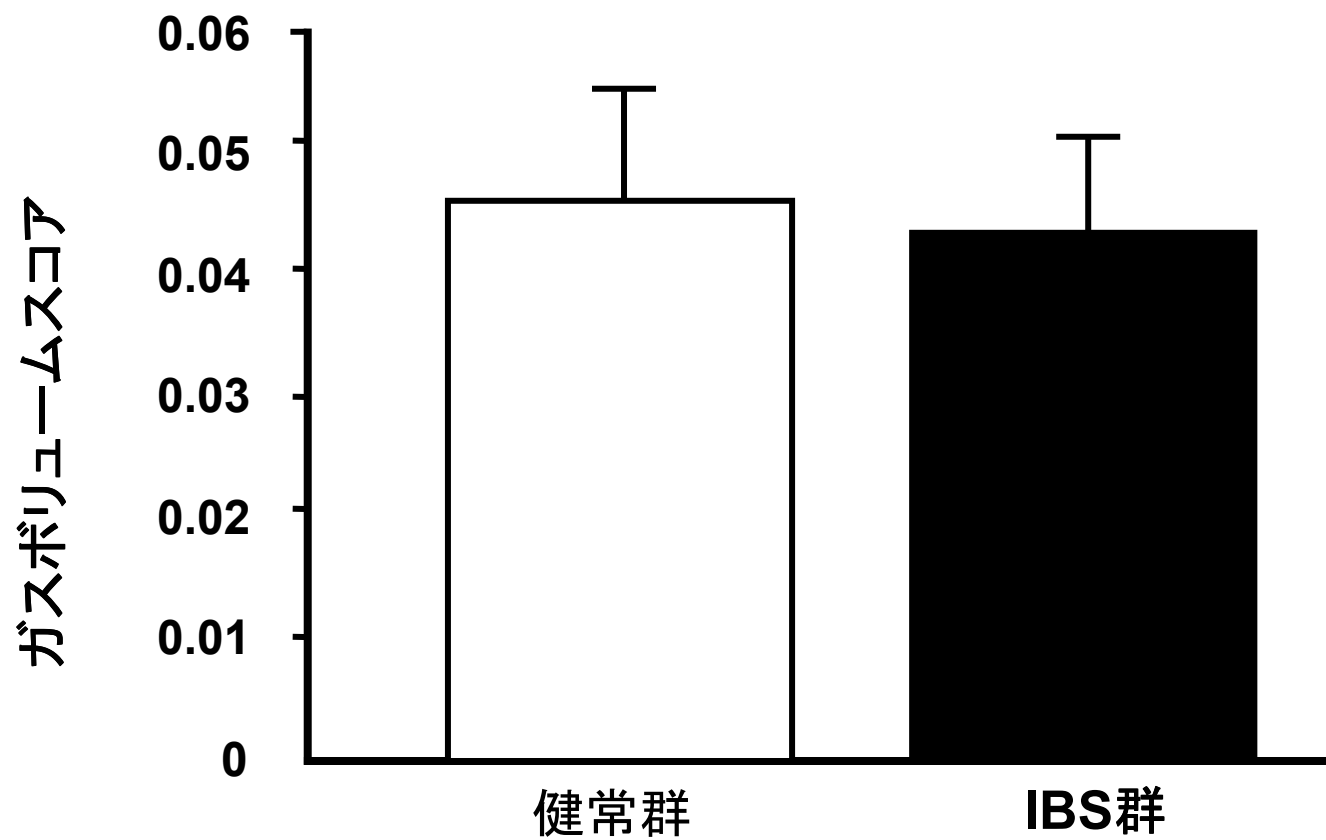


図 4. 腸内ガス量の比較

値は平均値 ± 標準偏差で示し、比較にはスチューデントのt検定を用いた。有意差なし。

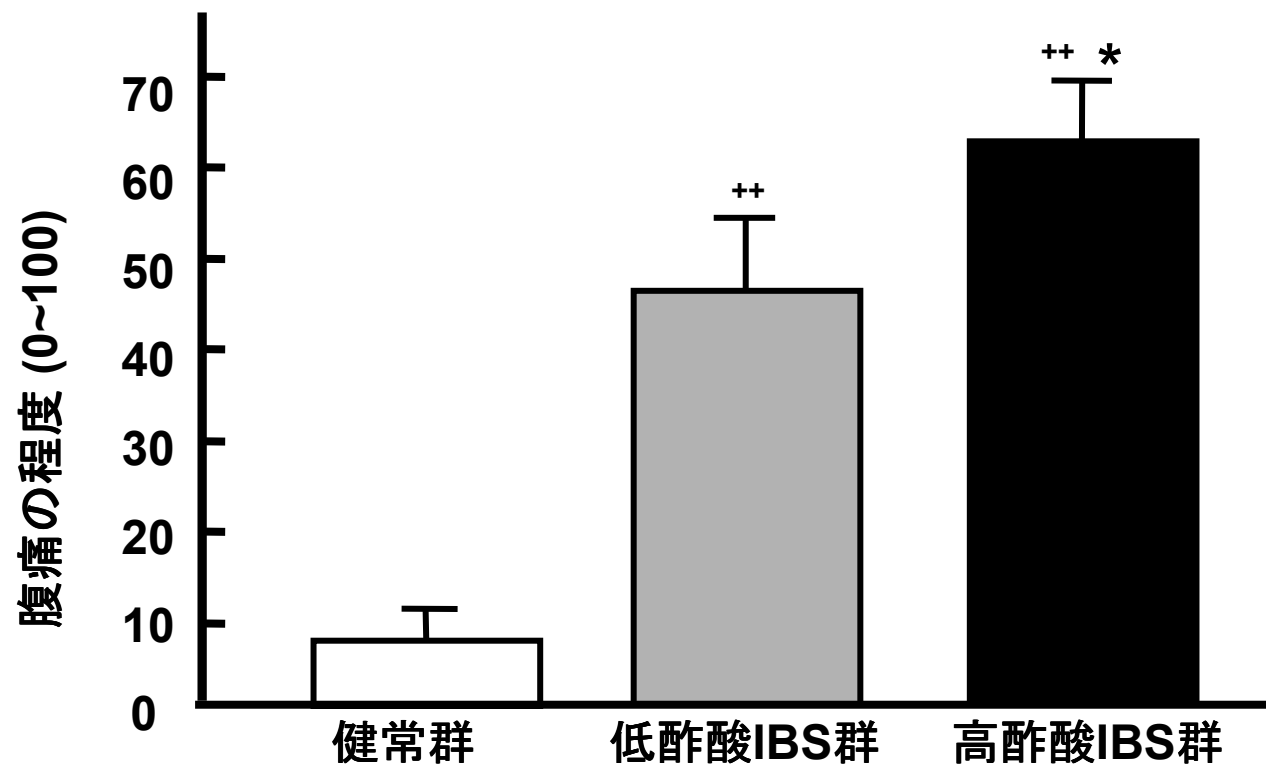


図 5A. 酢酸レベルと症状の関連; IBS Severity Indexの腹痛の程度

値は平均値 ± 標準偏差で示し、比較には一元配置分散分析 (A, B, Cともに $P < 0.001$)とその後の検定を用いた。

その後の検定: * $P < 0.05$ 対低酢酸IBS群, ++ $P < 0.05$, +++ $P < 0.01$ 対健常群

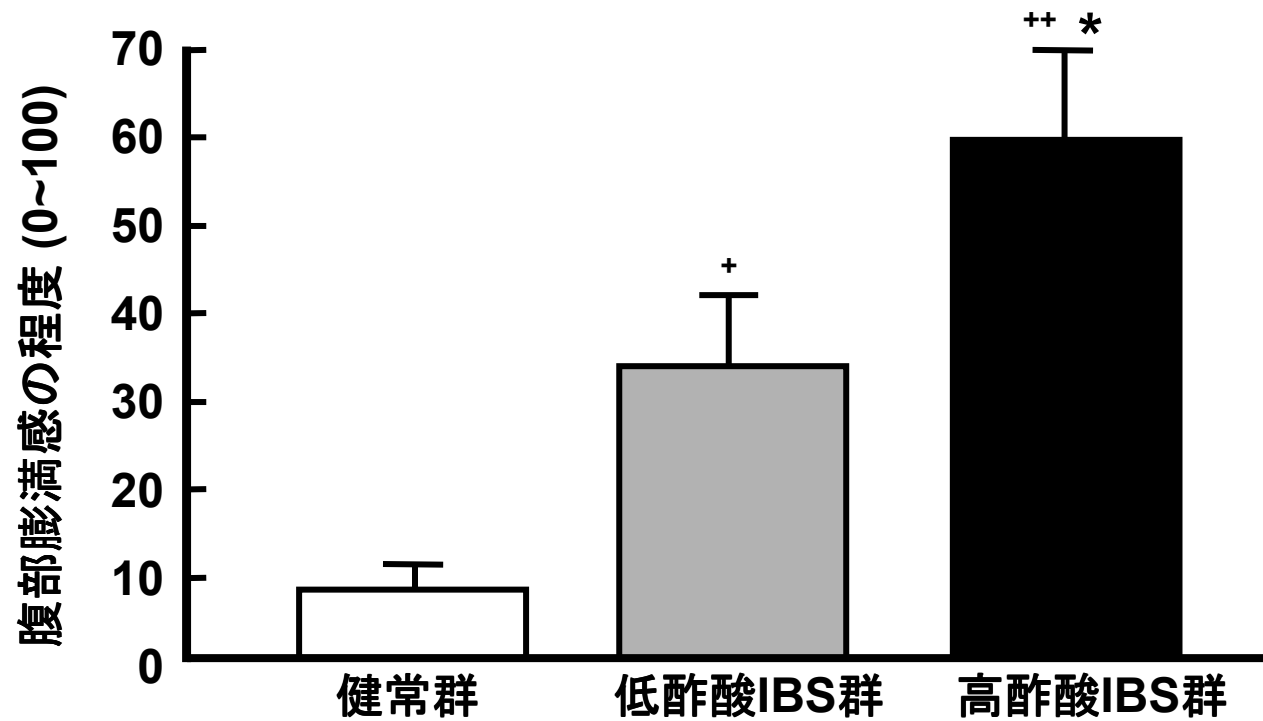


図 5B. 酢酸レベルと症状の関連; IBS Severity Indexの腹部膨満感の程度

値は平均値 ± 標準偏差で示し、比較には一元配置分散分析 (A, B, Cともに $P < 0.001$)とその後の検定を用いた。

その後の検定: * $P < 0.05$ 対低酢酸IBS群, + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ 対健常群

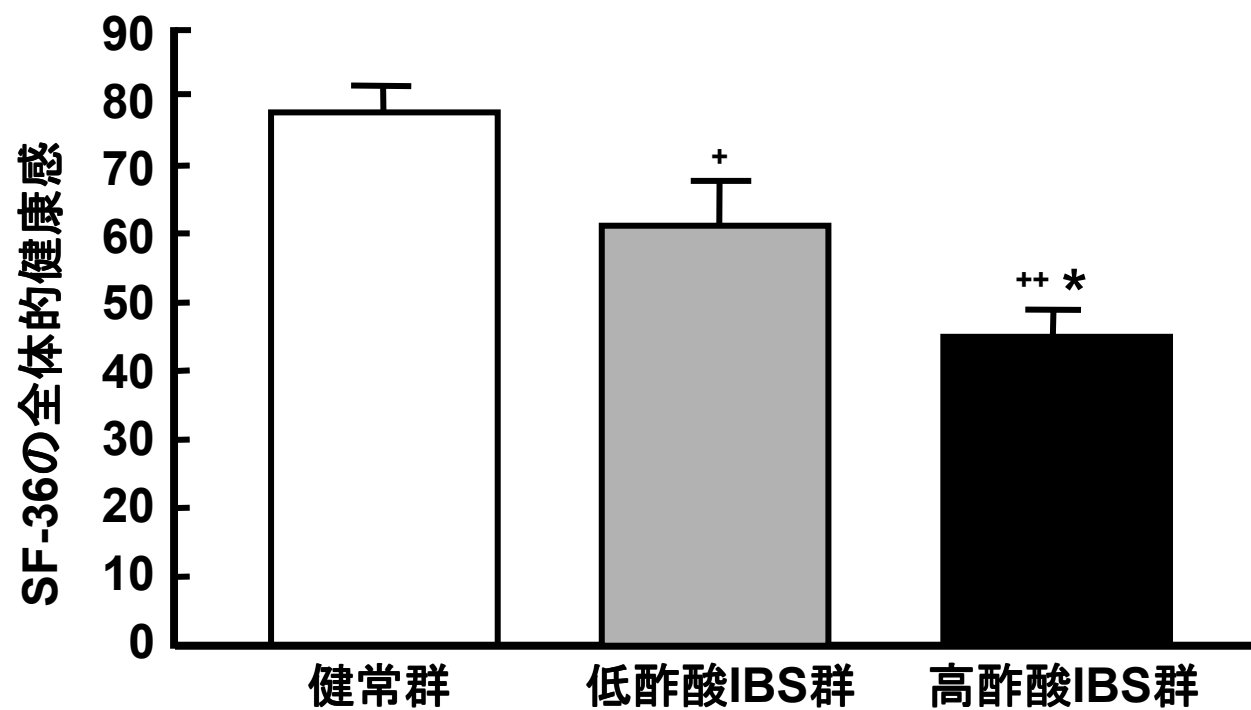


図 5C. 酢酸レベルと症状の関連; Short-Form 36-Item Health Survey (SF-36)の全体的健康感
値は平均値 ± 標準偏差で示し、比較には一元配置分散分析 (A, B, Cともに $P < 0.001$)とその後の検定を用いた。
その後の検定: * $P < 0.05$ 対低酢酸IBS群, + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ 対健常群

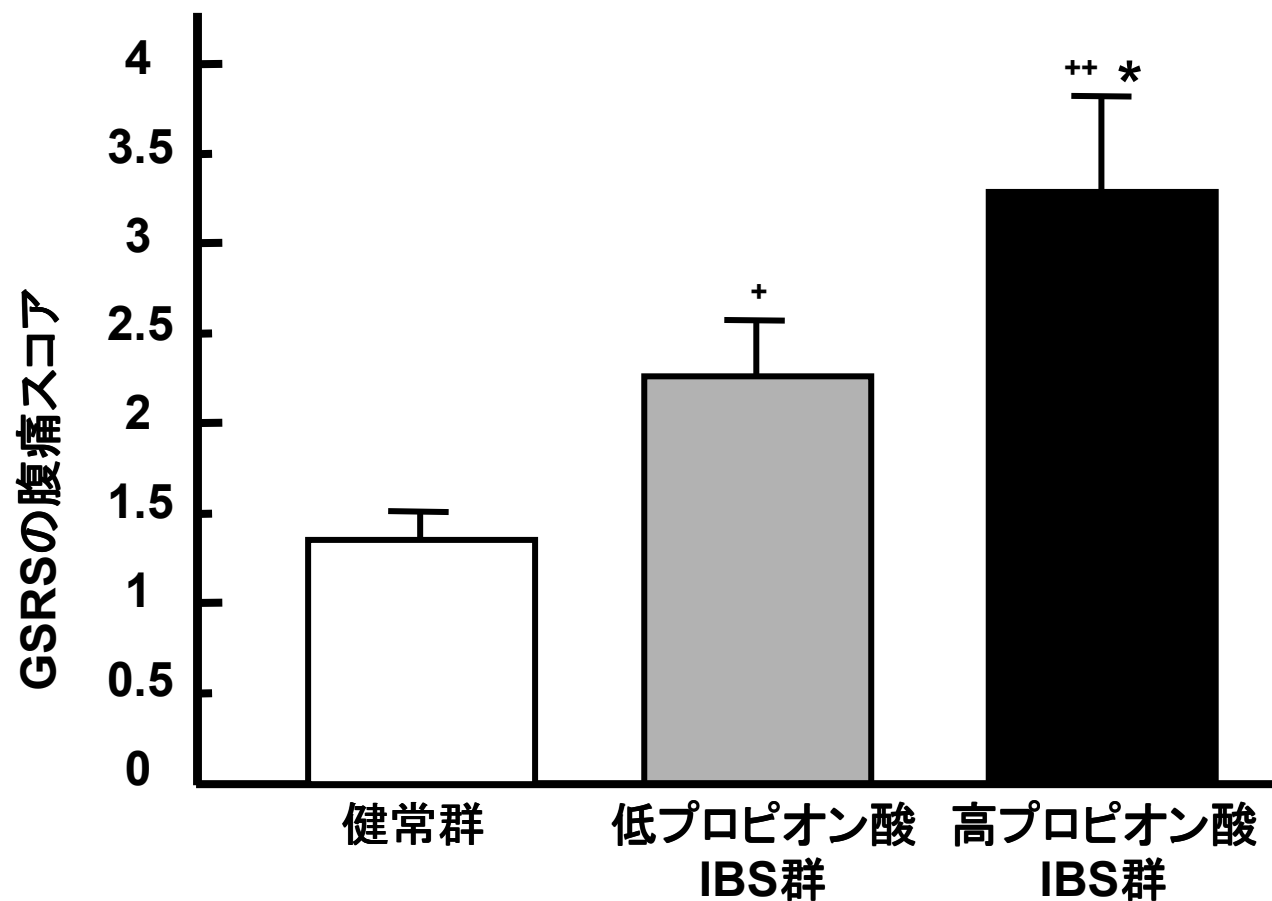


図 6A. プロピオン酸レベルと症状の関連; Gastrointestinal Symptoms Rating Scale (GSRs)の腹痛スコア
値は平均値 ± 標準偏差で示し、比較には一元配置分散分析 (A, B, Cともに $P < 0.001$, Dは $P = 0.002$)とその後の検定を用いた。
その後の検定: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 対低プロピオン酸IBS群, + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$ 対健常群

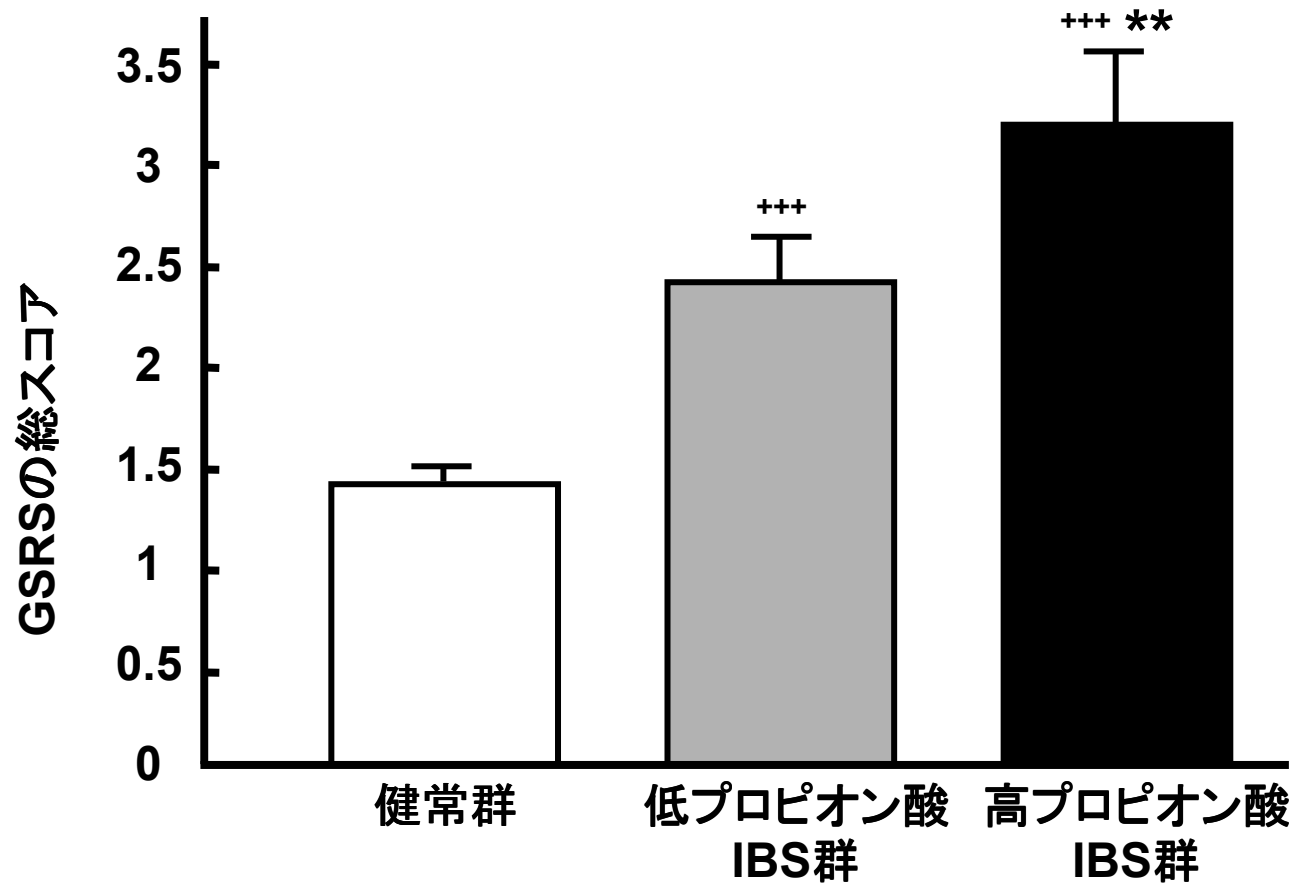


図 6B. プロピオン酸レベルと症状の関連; Gastrointestinal Symptoms Rating Scale (GRS)の総スコア
値は平均値 ± 標準偏差で示し、比較には一元配置分散分析 (A, B, Cともに $P < 0.001$, Dは $P = 0.002$)とその後の検定を用いた。
その後の検定: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 対低プロピオン酸IBS群, + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$ 対健常群

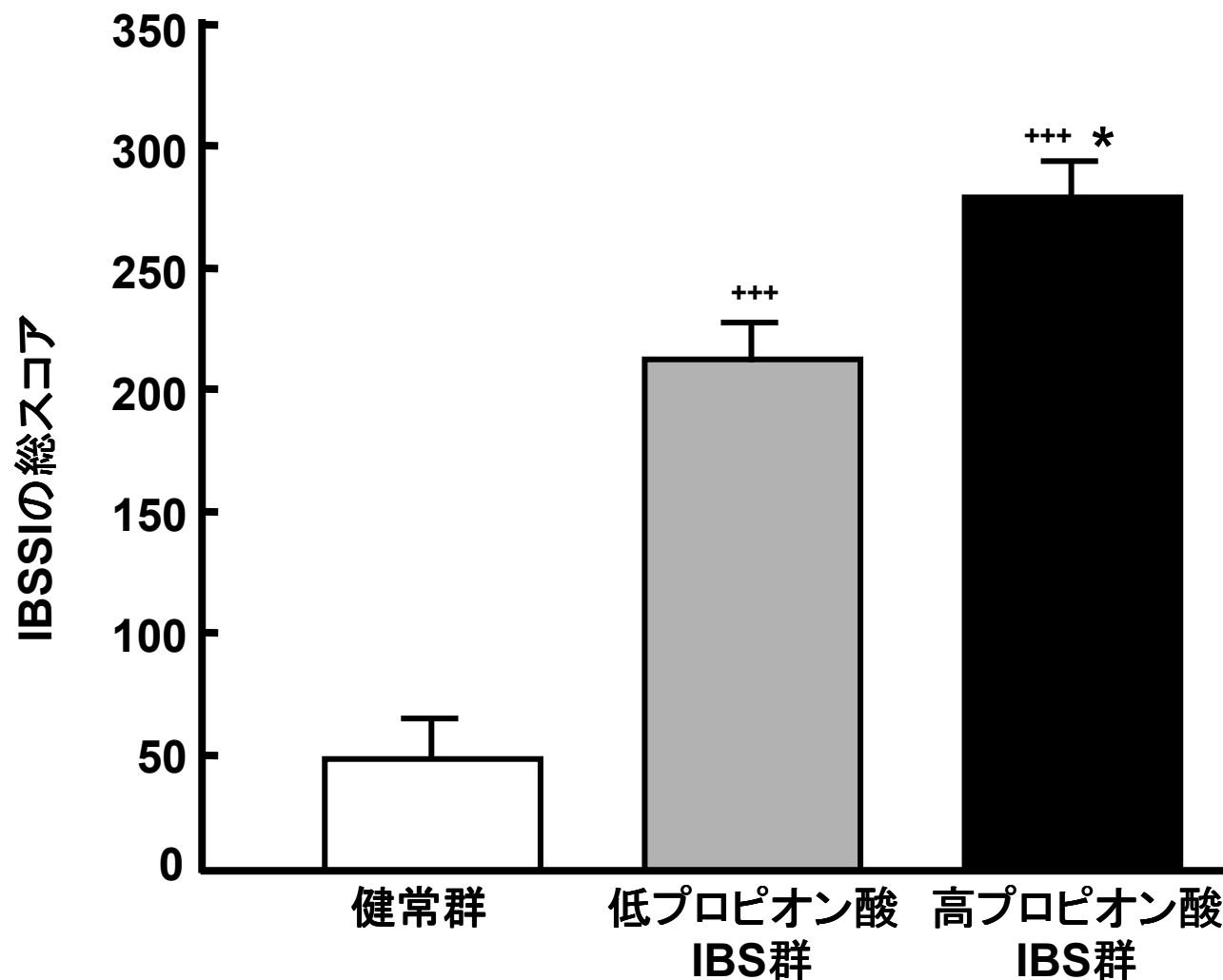


図 6C. プロピオン酸レベルと症状の関連; IBS Severity Index (IBSSI)の総スコア

値は平均値 ± 標準偏差で示し、比較には一元配置分散分析 (A, B, Cともに $P < 0.001$, Dは $P = 0.002$)とその後の検定を用いた。
その後の検定: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 対低プロピオン酸IBS群, + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$ 対健常群

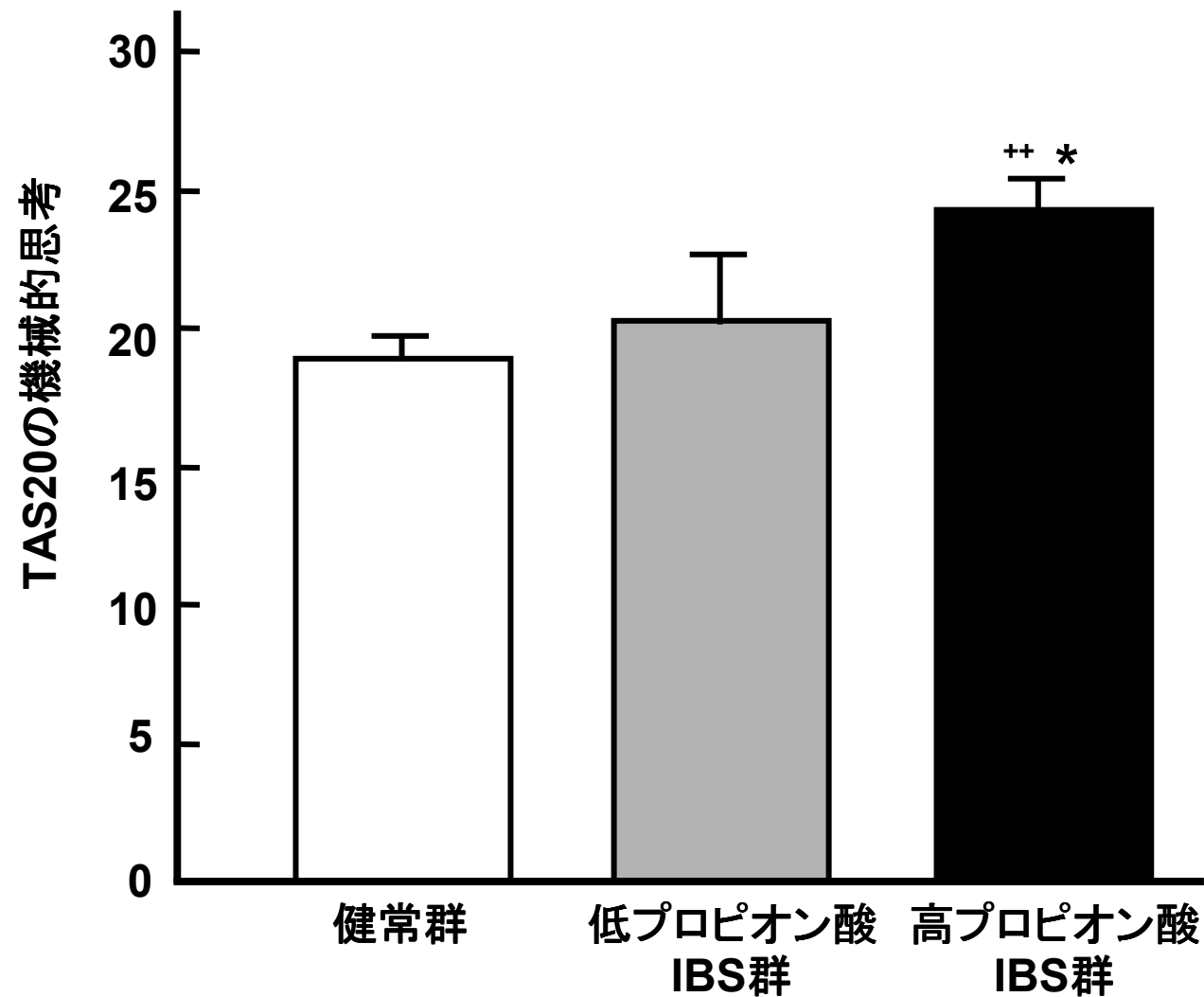


図 6D. プロピオン酸レベルと症状の関連; Tronto Alexithymia Scale-20 (TAS-20)の機械的思考

値は平均値 ± 標準偏差で示し、比較には一元配置分散分析 (A, B, Cともに $P < 0.001$, Dは $P = 0.002$)とその後の検定を用いた。

その後の検定: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 対低プロピオン酸IBS群, + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$ 対健常群

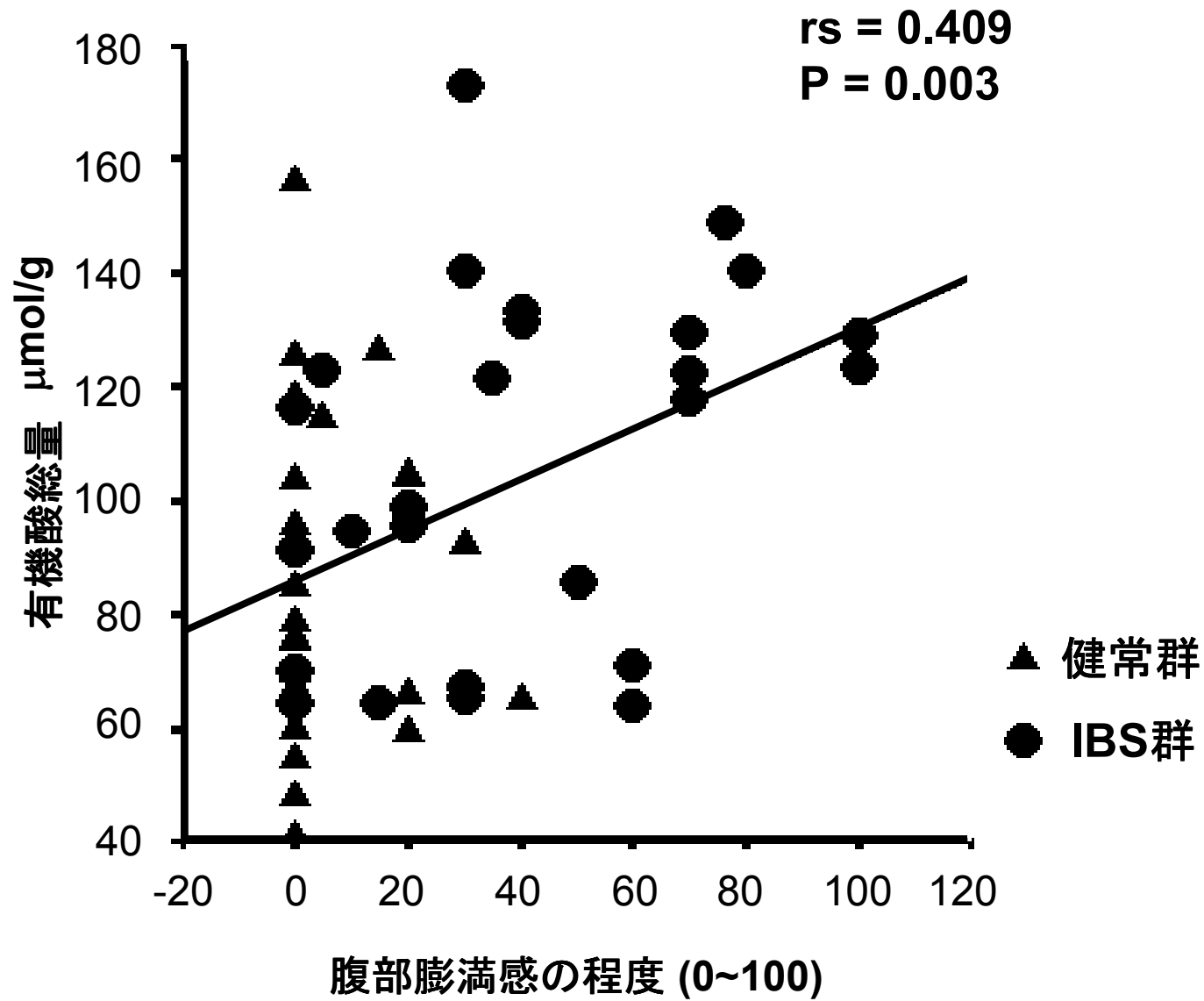


図 7. 有機酸総量とIBS Severity Indexの腹部膨満感スコアの相関分析
スピアマンの相関係数 $r_s = 0.409$, $P = 0.003$

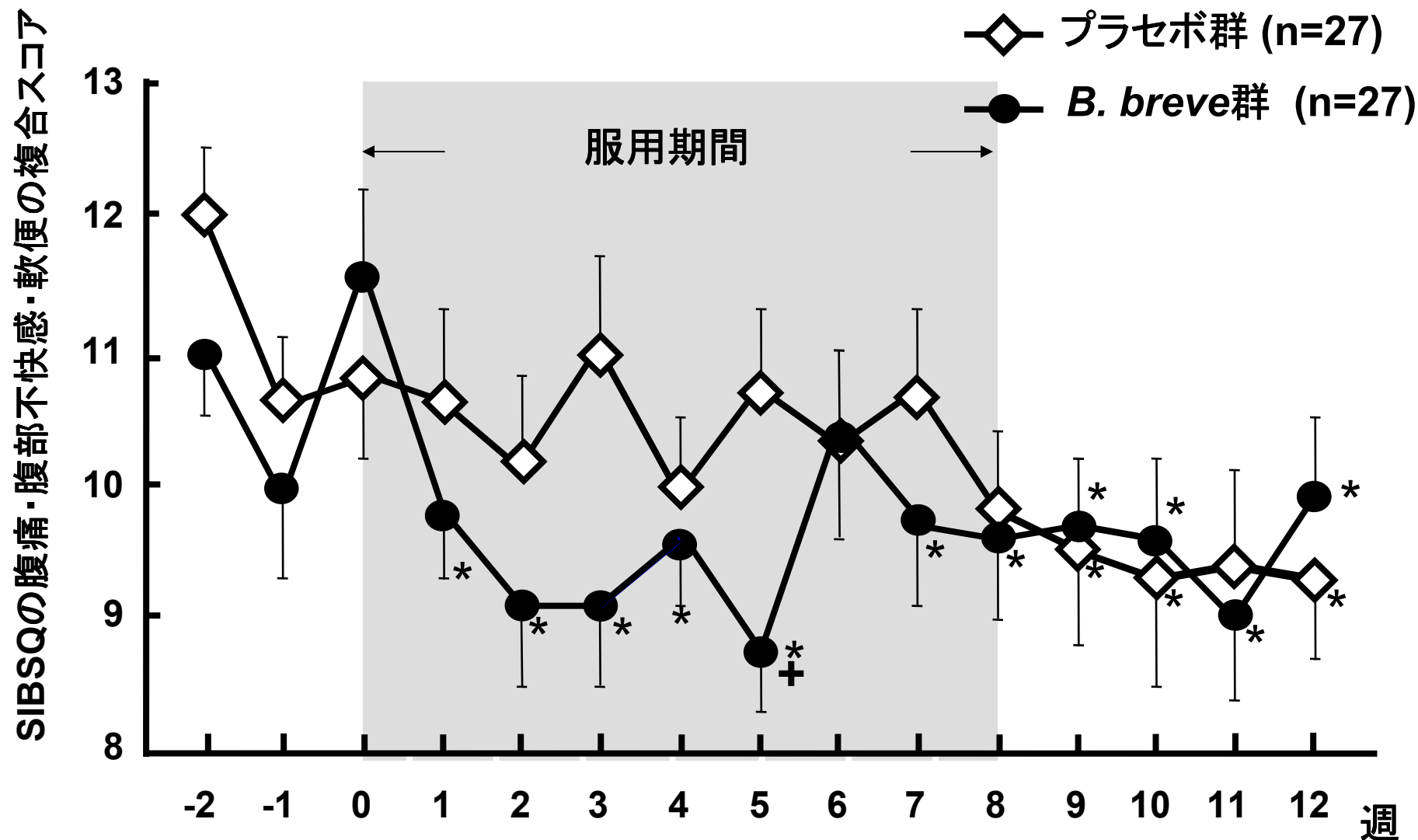


図 8. Self-reported IBS Questionnaire (SIBSQ)の腹痛・腹部不快感・軟便の複合スコアにおける*B. breve*の効果 (プライマリーエンドポイント)

値は平均値 ± 標準偏差で示し、反復測定二元配置分散分析の結果、

有意な期間の効果 ($P < 0.0001$)と、群 × 期間の相互作用が認められた ($P = 0.036$)。

群内の比較には一元配置分散分析およびその後の検定を用い (プラセボ群; $P = 0.0017$, *B. breve*群; $P < 0.0001$, * $P < 0.05$ 対ベースライン)、群間の比較にはスチューデントのt検定を用いた (+ $P < 0.05$ 対プラセボ群)。

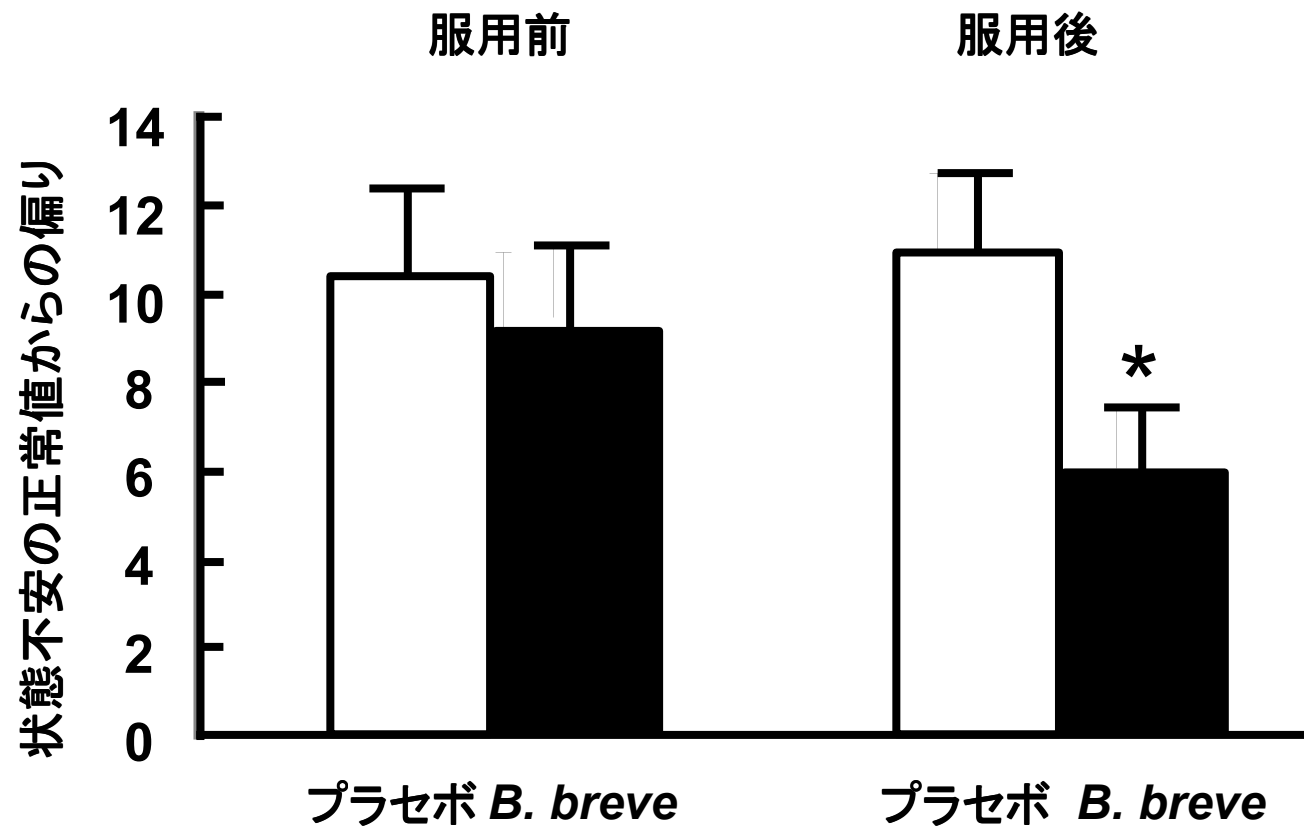


図 9. 状態不安の正常値からの偏りへの *B. breve* の効果

値は平均値 ± 標準偏差で示し、群間の比較にはスチューデントの t 検定を用いた。*P = 0.047 対プラセボ群

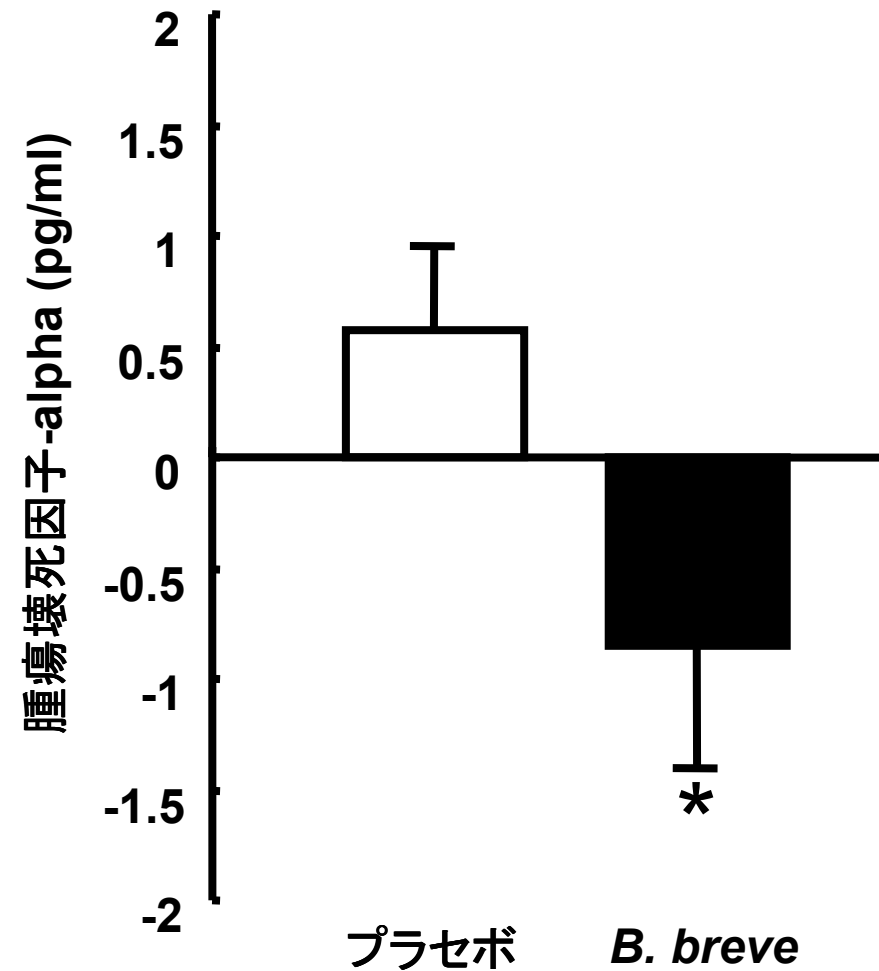


図 10A. サイトカインレベルへの*B. breve*の効果; 腫瘍壊死因子- α (pg/ml)

値は平均値 \pm 標準偏差で示し、反復測定二元配置分散分析の結果有意な群 \times 期間の交互作用が認められた ($P = 0.015$)。

服用前後の変化量の群間の比較はスチューデントのt検定を用いて行い、有意な群間の差が認められた ($P = 0.015$)。

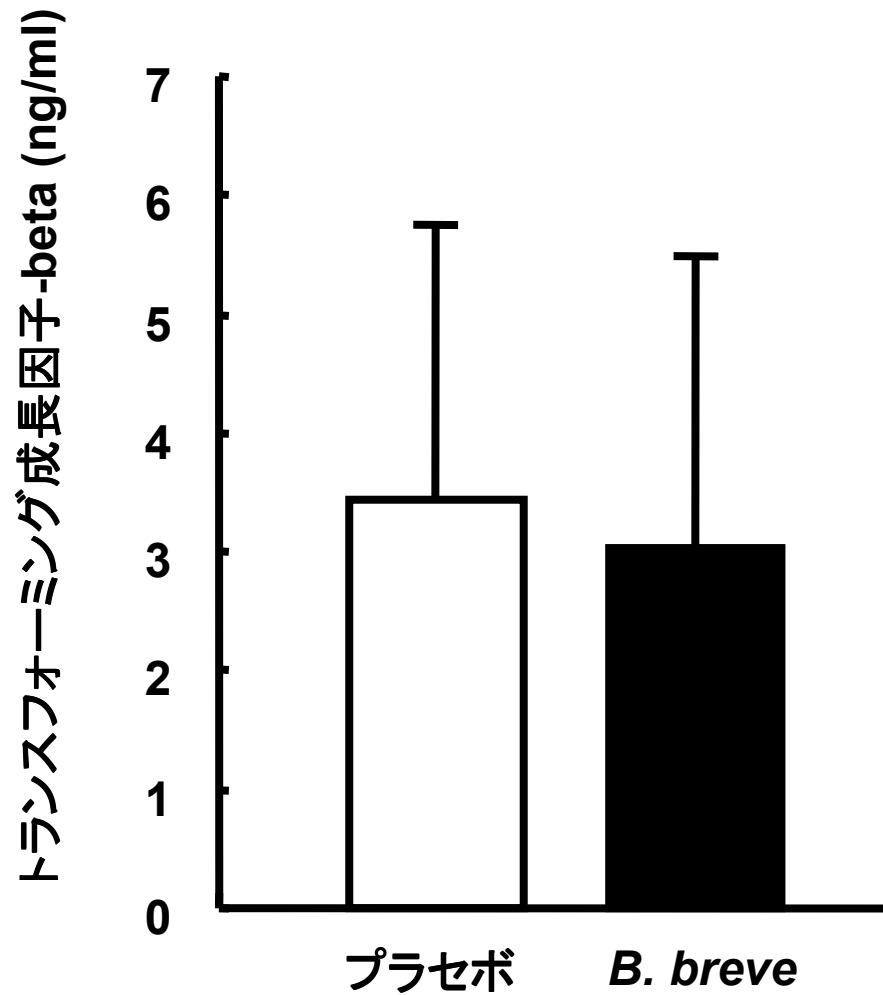


図 10B. サイトカインレベルへの*B. breve*の効果; トランスフォーミング成長因子- β (ng/ml).
値は平均値 \pm 標準偏差で示し、反復測定二元配置分散分析では有意差は認められなかった。
服用前後の変化量の群間の比較はスチューデントのt検定を用いて行い、有意差は認められなかった。

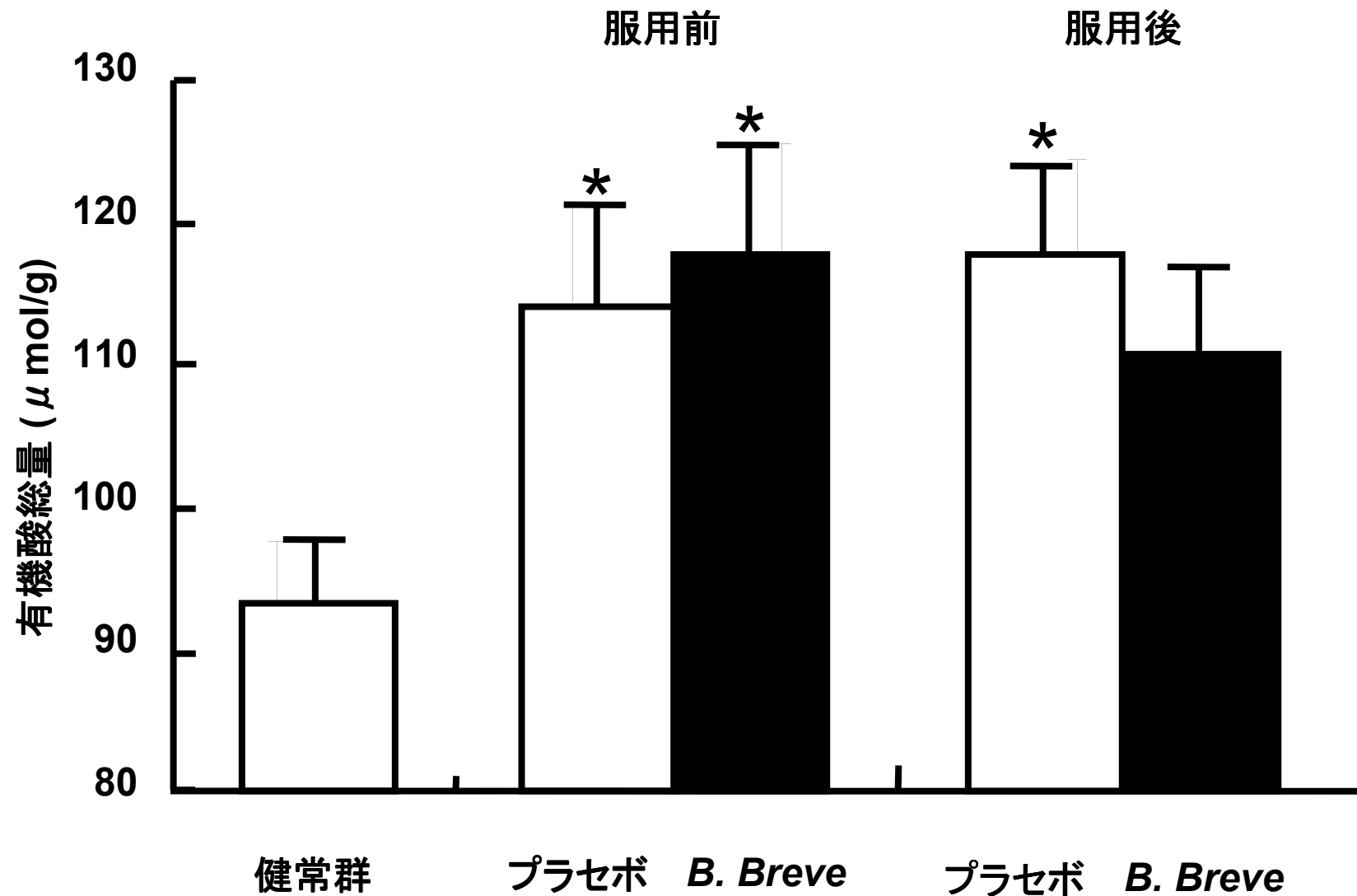


図 11. 有機酸総量への*B. breve*の効果

値は平均値 \pm 標準偏差で示し、一元配置分散分析の結果、服用前のプラセボ群、服用前の*B. breve*群ともに健常群に比べて高値であるのに対し、服用後では*B. breve*群のみ健常者との有意差は消失した。* $P < 0.05$ 対健常群

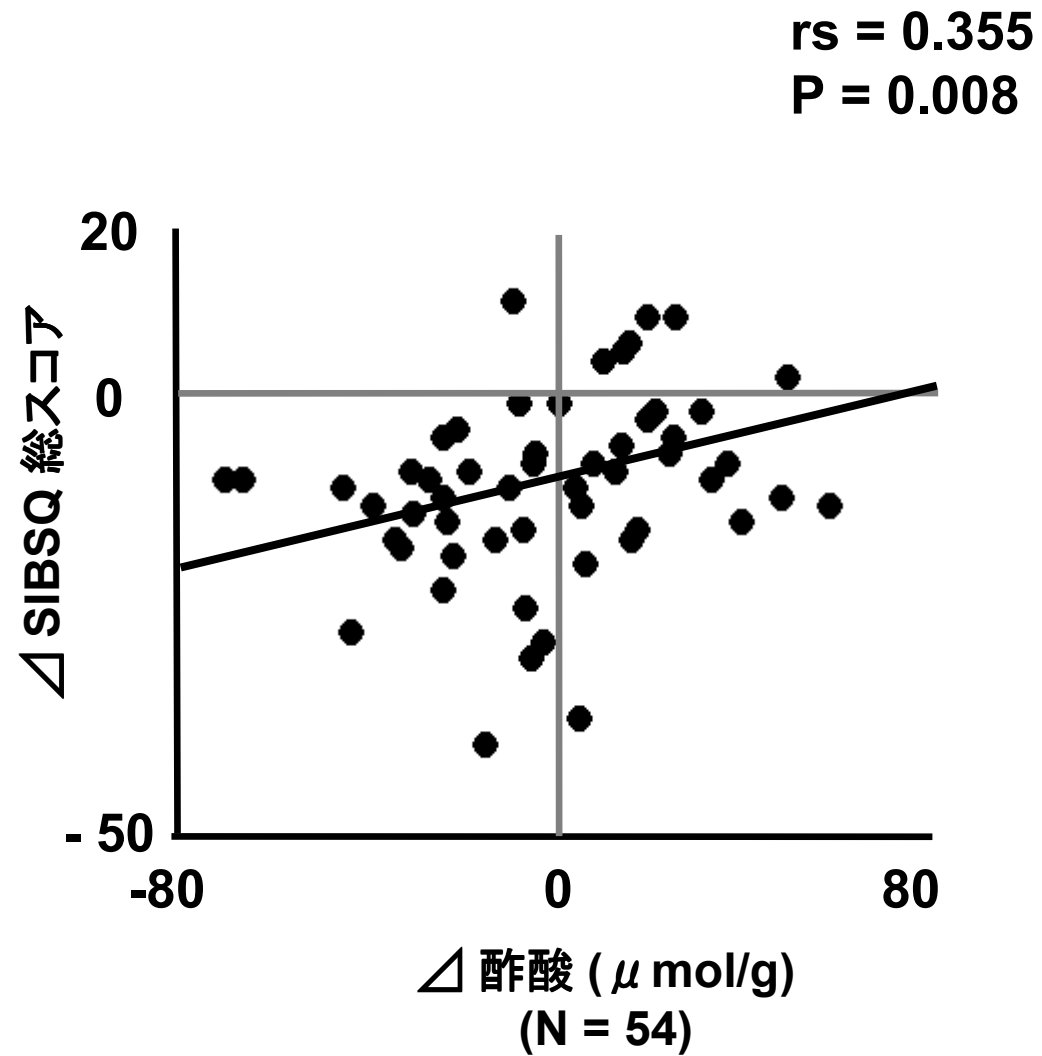


図 12A. Δ 酢酸と Δ 消化器症状の相関分析; Δ 酢酸 \times Δ Self-reported IBS Questionnaire (SIBSQ)総スコア
スピアマンの相関係数; $r_s = 0.355$, $P = 0.008$

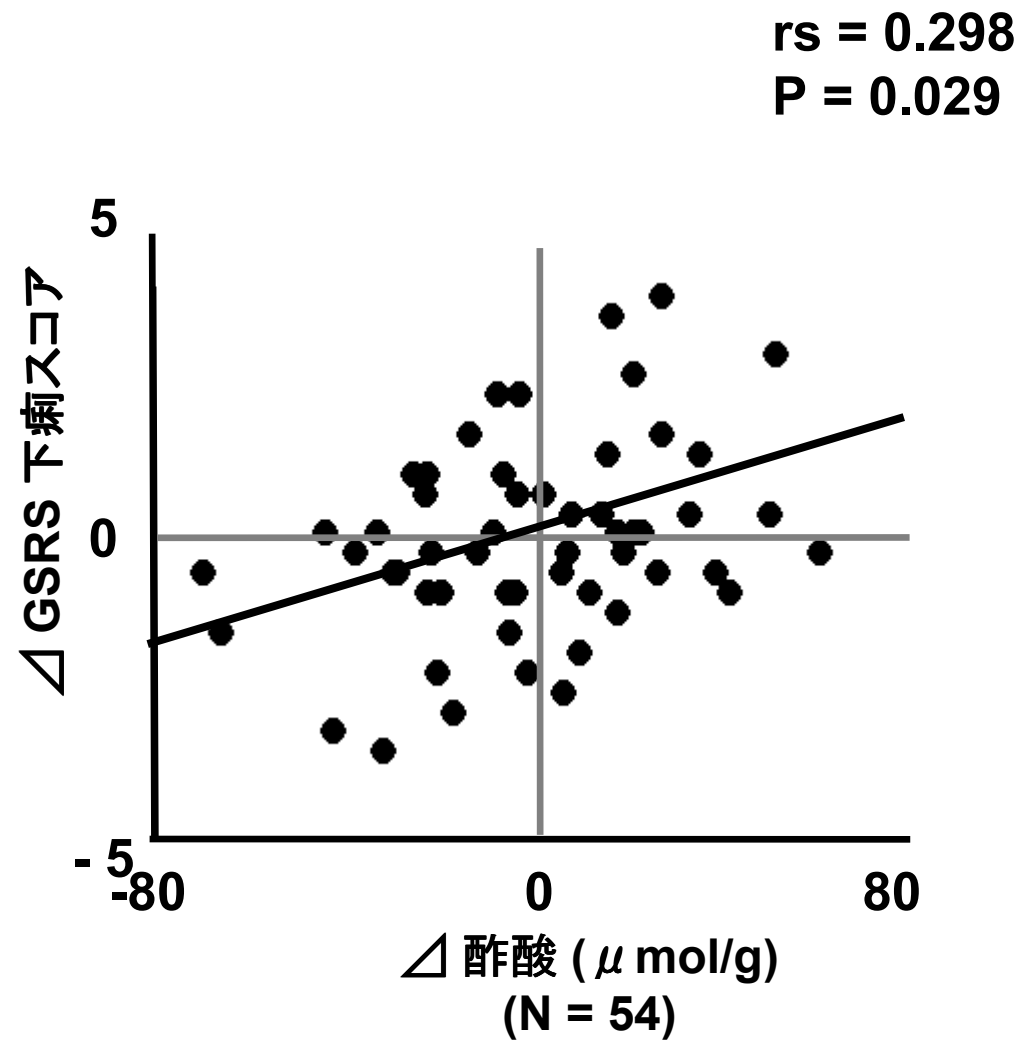


図 12B. Δ 酢酸とΔ 消化器症状の相関分析; Δ 酢酸x Δ Gastrointestinal Symptoms Rating Scale (GSRs)下痢スコア
スピアマンの相関係数; $r_s = 0.298$, $P = 0.029$

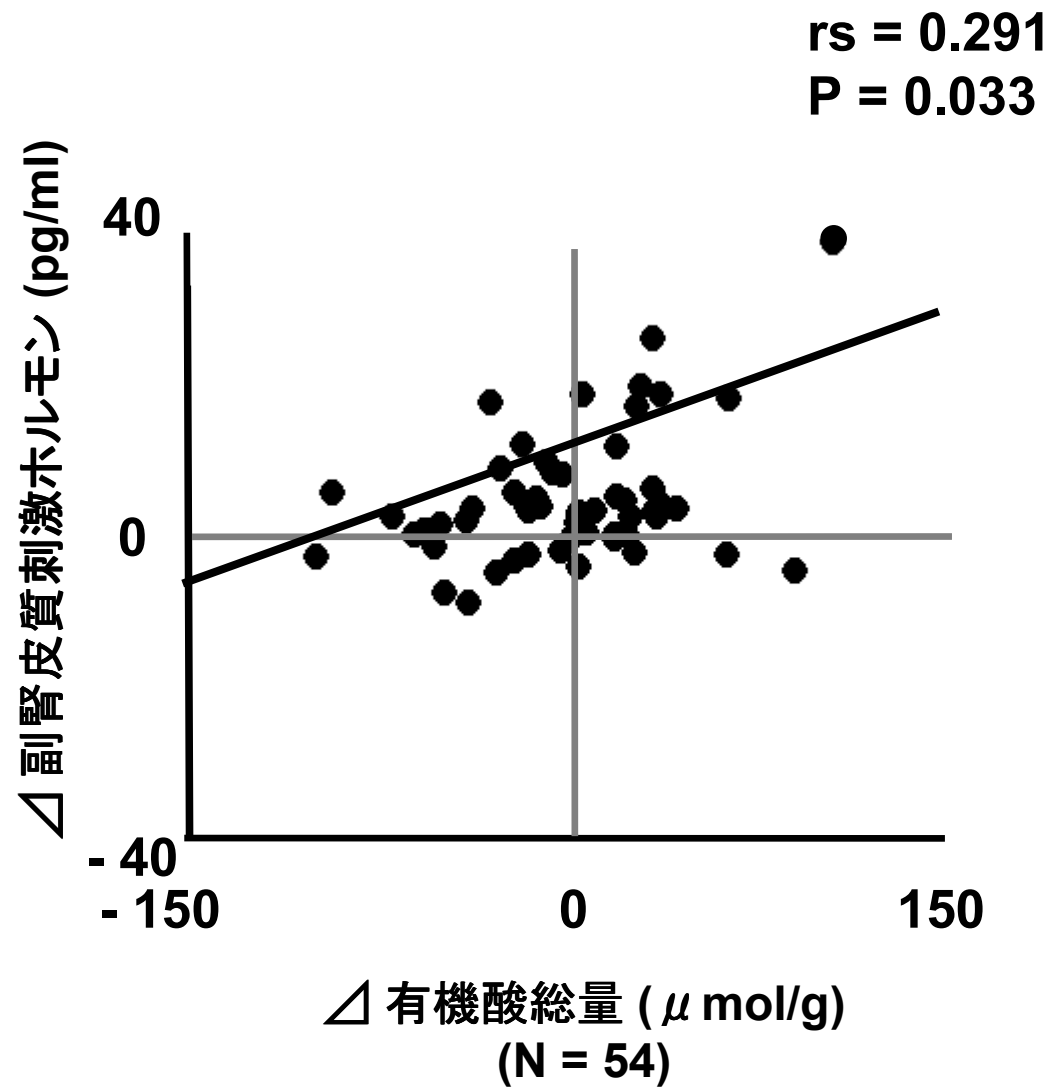


図 13. Δ 有機酸総量と Δ 副腎皮質刺激ホルモンの相関分析
スピアマンの交換係数 $r_s = 0.291$, $P = 0.033$

12. 表

表 1. Study #1 の対象

	健常群 (n=26)	IBS 群 (n=26)	健常群対 IBS 群
年齢	21.9 ± 2.9	21.7 ± 2.0	有意差なし
性別 (女性/男性)	13/13	13/13	有意差なし
IBS の優勢症状			
便秘型	-	11	
下痢型	-	8	
混合型	-	7	
1 週間のヨーグルトの摂取頻度	1.82 ± 1.52	1.98 ± 2.34	有意差なし

値は平均値 ± 標準偏差で示し、年齢の比較にはスチューデントの t 検定を、性別の比較にはカイ二乗検定を、ヨーグルトの摂取頻度にはマン・ホイットニーの U 検定を用いた。群間に有意差は認められなかった。

表 2. 16S r RNA 標的遺伝子菌群特異的プライマー

標的細菌群名	プライマー	塩基配列	サイズ (bp)	引用文献
<i>Clostridium coccooides</i> グループ	g-Ccoc477-F	AAATGACGGTACCTGACTAA	440	44
	g-Ccoc895-R	CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA		
<i>Clostridium leptum</i> サブグループ	sg-Clept933-F	GCACAAGCAGTGGAGT	239	45
	sg-Clept1164-R	CTTCCTCCGTTTTGTCAA		
<i>Bacteroides fragilis</i> グループ	g-Bfra148-F2	AYAGCCTTTCGAAAGRAAGAT	495	44
	g-Bfra626-R	CCAGTATCAACTGCAATTTTA		
<i>Bifidobacterium</i>	g-Bifid153-F	CTCCTGGAAACGGGTGG	550	44
	g-Bifid699-R	GGTGTCTCTCCCGATATCTACA		
<i>Atopobium</i> 群	g-Atopo292-F	GGGTTGAGAGACCGACC	190	45
	g-Atopo488-R	CGGRGCTTCTTCTGCAGG		
<i>Prevotella</i>	g-Prevo808-F	CACRGTAACGATGGATGCC	513	44
	g-Prevo1311-R	GGTCGGGTTGCAGACC		
<i>Eubacterium cylindroides</i> グループ	g-Ecylin479-F	GTGAYGGTAKCTTACCAGA	416	43
	g-Ecylin886-R	CTTGCGTGCATACTCCC		
<i>Clostridium ramosum</i> サブグループ	sg-Cram171-F	GACACTGCATGGTGACC	466	43
	sg-Cram626-R	GGTTTCTATGGCTTACTG		
<i>Veillonella</i>	g-Veillo68-F	GRAGAGCGATGGAAGCTT	459	43
	g-Veillo490-R	CCGTGGCTTTCTATTCC		
<i>Fusobacterium</i>	g-Fuso862-F	CWAACGCGATAAGTAATC	317	43
	g-Fuso1150-R	GCAGGCAGTATCGCAT		

表 3. Study #2 の対象

	プラセボ群 (n=27)	<i>B. breve</i> 群 (n=27)	プラセボ群対 <i>B. breve</i> 群
年齢	22.3 ± 2.6	23.2 ± 4.6	有意差なし
性別 (女性/男性)	17/10	16/11	有意差なし
IBS の優勢症状			
便秘型	9	6	有意差なし
下痢型	8	10	有意差なし
混合型	10	11	有意差なし
1 週間のヨーグルトの摂取頻度	1.82 ± 1.82	1.94 ± 2.12	有意差なし

値は平均値 ± 標準偏差で示し、年齢の比較にはスチューデントの *t* 検定を、性別と IBS のサブタイプの比較にはカイ二乗検定を、ヨーグルトの摂取頻度にはマン・ホイットニーの *U* 検定を用いた。群間に有意差は認められなかった。

表 4. 腸内細菌叢の比較

標的細菌名	健常群 (n=26)	IBS 群 (n=26)	P 値
定量的ポリメラーゼ連鎖反応法			
<i>Clostridium coccooides</i> グループ	10.6 ± 0.3	10.6 ± 0.4	0.456
<i>Clostridium leptum</i> サブグループ	10.1 ± 0.5	9.9 ± 0.5	0.252
<i>Bacteroides fragilis</i> グループ	9.9 ± 0.6	9.9 ± 0.7	0.996
<i>Bifidobacterium</i>	9.7 ± 0.9	9.4 ± 0.9	0.343
<i>Atopobium</i> 群	9.4 ± 1.0	9.3 ± 1.0	0.703
<i>Prevotella</i>	6.4 ± 0.9	6.8 ± 1.5	0.197
<i>Eubacterium cylindroides</i> グループ	8.7 ± 0.8	8.6 ± 0.8	0.770
<i>Clostridium ramosum</i> サブグループ	8.0 ± 0.8	8.0 ± 0.8	0.886
<i>Veillonella</i>	6.8 ± 0.7	7.2 ± 0.8	0.046*
<i>Fusobacterium</i>	6.6 ± 1.0	6.7 ± 1.0	0.775
培養法			
<i>Lactobacillus</i>	4.6 ± 1.6	5.6 ± 1.9	0.031*
<i>Enterobacteriaceae</i>	6.9 ± 1.1	6.7 ± 0.9	0.534
<i>Enterococcus</i>	7.1 ± 1.2	7.1 ± 1.1	0.809
DAPI 染色法			
細菌総数	11.0 ± 0.3	10.9 ± 0.2	0.087

値 (\log_{10} bacteria/g)は平均値 ± 標準偏差 (検出率%)で示し、比較にはスチューデントの t 検定を用いた。

*P < 0.05

表 5. 消化器症状、疾患関連 QOL の比較

	健常群 (n=26)	IBS 群 (n=26)	P 値
IBS Severity Index	30.0 (0.0 – 190.0)	250.0 (75.0 – 400.0)	<.001***
Gastrointestinal Symptoms Rating Scale			
総スコア	1.3 (1.0 – 2.3)	2.7 (1.3 – 5.0)	<.001***
逆流	1.0 (1.0 – 2.0)	1.5 (1.0 – 7.0)	0.001**
腹痛	1.2 (1.0 – 2.7)	2.3 (1.0 – 6.3)	<.001***
消化不良	1.3 (1.0 – 3.0)	2.5 (1.0 – 5.0)	<.001***
下痢	1.0 (1.0 – 2.7)	3.2 (1.0 – 7.0)	<.001***
便秘	1.3 (1.0 – 4.0)	3.0 (1.0 – 6.0)	<.001***
Self-reported IBS Questionnaire	27.0 (14.0 – 42.0)	51.0 (35.0 – 71.0)	<.001***
IBS-QOL			
憂うつ	100.0 (84.4 – 100.0)	81.3 (25.0 – 100.0)	<.001***
活動制限	100.0 (78.6 – 100.0)	78.6 (28.6 – 100.0)	<.001***
ボディ・イメージ	100.0 (75.0 – 100.0)	81.3 (37.5 – 100.0)	<.001***
健康に対する心配	100.0 (75.0 – 100.0)	83.3 (16.7 – 100.0)	<.001***
食事回避	100.0 (58.3 – 100.0)	79.2 (25.0 – 100.0)	<.001***
社会生活	100.0 (75.0 – 100.0)	84.4 (12.5 – 100.0)	<.001***
性的問題	100.0 (87.5 – 100.0)	100.0 (50.0 – 100.0)	0.01**
人間関係	100.0 (83.3 – 100.0)	91.7 (58.3 – 100.0)	<.001***

値は中央値 (最小値 – 最大値)で示し、比較にはマン・ホイットニーの U 検定を用いた。**P < 0.01, ***P < 0.001

表 6. 一般 QOL、陰性情動の比較

	健常群 (n=26)	IBS 群 (n=26)	P 値
Short-Form 36-Item Health Survey			
身体機能	100.0 (95.0 – 100.0)	100.0 (65.0 – 100.0)	0.102
日常役割機能 (身体)	100.0 (62.5 – 100.0)	90.6 (50.0 – 100.0)	0.005**
体の痛み	84.0 (32.0 – 100.0)	62.0 (20.0 – 100.0)	<.001***
全体的健康感	84.5 (20.0 – 100.0)	51.0 (25.0 – 97.0)	<.001***
活力	65.6 (12.5 – 87.5)	50.0 (0.0 – 75.0)	0.006**
社会生活機能	100.0 (37.5 – 100.0)	68.8 (0.0 – 100.0)	<.001***
日常役割機能 (精神)	91.7 (50.0 – 100.0)	50.0 (0.0 – 100.0)	0.013*
心の健康	72.5 (25.0 – 95.0)	57.5 (5.0 – 90.0)	0.010**
うつ病自己評価尺度	34.0 (24.0 – 51.0)	44.0 (25.0 – 65.0)	<.001***
状態-特性不安検査			
総スコア	82.5 (61.0 – 125.0)	101.0 (57.0 – 142.0)	0.001**
状態不安	39.5 (28.0 – 66.0)	49.0 (31.0 – 73.0)	0.009**
特性不安	42.5 (29.0 – 62.0)	51.0 (26.0 – 78.0)	0.001**
自覚ストレス調査票	23.5 (8.0 – 38.0)	31.0 (11.0 – 50.0)	0.005**
Tronto Alexithymia Scale-20			
総スコア	46.5 (27.0 – 72.0)	58.0 (33.0 – 70.0)	0.016*
感情同定困難	14.0 (7.0 – 29.0)	20.0 (7.0 – 33.0)	0.013*
感情伝達困難	14.0 (6.0 – 24.0)	15.0 (8.0 – 20.0)	0.514
機械的思考	18.5 (10.0 – 25.0)	20.5 (13.0 – 28.0)	0.022*

値は中央値 (最小値 – 最大値)で示し、比較にはマン・ホイットニーの U 検定を用いた。*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

表 7. 腸内細菌叢への *B. breve* の効果

標的細菌名	プラセボ群 (n = 27)		<i>B. breve</i> 群 (n = 27)		P 値 (群の効果)
	服用前	服用後	服用前	服用後	
定量的ポリメラーゼ連鎖反応法					
<i>Clostridium coccooides</i> グループ	10.6 ± 0.4	10.5 ± 0.4	10.6 ± 0.4	10.5 ± 0.4	0.655
<i>Clostridium leptum</i> サブグループ*	9.9 ± 0.5	9.7 ± 0.6	10.0 ± 0.5	9.8 ± 0.7	0.533
<i>Bacteroides fragilis</i> グループ*	9.8 ± 0.7	9.5 ± 1.0	10.0 ± 0.5	9.8 ± 0.8	0.221
<i>Bifidobacterium</i>	9.5 ± 0.9	9.6 ± 1.1	9.4 ± 1.0	9.5 ± 0.7	0.592
<i>Atopobium</i> 群 [▲]	9.4 ± 0.8	9.5 ± 0.8	9.6 ± 0.9	9.5 ± 0.9	0.710
<i>Plevotella</i>	6.7 ± 1.4	6.6 ± 1.4	7.0 ± 1.5	6.8 ± 1.6	0.611
<i>Eubacterium cylindroides</i> グループ	8.5 ± 0.8	8.2 ± 1.2	8.7 ± 0.9	8.7 ± 0.9	0.167
<i>Clostridium ramosum</i> サブグループ	7.5 ± 1.0	7.4 ± 0.8	8.1 ± 0.9	8.0 ± 1.0	0.018 [△]
<i>Veillonella</i>	7.1 ± 0.7	7.1 ± 0.7	7.1 ± 0.8	7.2 ± 0.8	0.833
<i>Fusobacterium</i>	6.5 ± 1.0	6.6 ± 1.1	6.6 ± 0.8	6.6 ± 0.9	0.923
培養法					
<i>Lactobacillus</i>	4.9 ± 1.8	4.6 ± 1.9	5.4 ± 1.9	5.3 ± 1.8	0.175
<i>Enterobacteriaceae</i>	6.9 ± 1.0	6.6 ± 1.4	6.7 ± 1.3	6.7 ± 1.5	0.880
<i>Enterococcus</i>	6.8 ± 1.2	7.0 ± 1.6	7.0 ± 1.2	6.9 ± 1.3	0.850
DAPI 染色法					
細菌総数	11.0 ± 0.4	10.9 ± 0.4	11.0 ± 0.3	10.9 ± 0.3	0.628

値 (\log_{10} bacteria/g)は平均値 ± 標準偏差で示し、分析には群×期間の反復測定二元配置分散分析を用いた。*Atopobium* 群には群×期間の交互作用の有意傾向があり ([△]P = 0.069)、*Clostridium leptum* サブグループおよび *Bacteroides fragilis* グループには有意な期間の効果が (*P < 0.05)、*Clostridium ramosum* サブグループには有意な群の効果が認められた ([△]P = 0.018)。